

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

"ESTUDIO DE LA REGULACION Y DE LA FUNCION DE RECEPTORES
ALFA ADRENÉRGICOS Y COLINÉRGICOS MUSCARÍNICOS.
EFECTO DE LA TOMINA PERTUÉSIS"

Tesis para optar por el Grado de:

DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA
(ESPECIALIDAD)

PRESENTA EL M. I. D.
JOSE LUIS DOMER MARTINEZ

México, D.F.

1994

TESIS CON
CALA DE CRONO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

I.	INTRODUCCION.....	1
II.	OBJETIVO.....	33
III.	ANTECEDENTES Y MODELOS DE ESTUDIO.....	35
IV.	EXPERIMENTAL.....	41
V.	RESULTADOS.....	42
VI.	COMENTARIOS GENERALES A LOS RESULTADOS.....	53
VII.	REFERENCIAS.....	70

RESUMEN:

"Estudio de la Regulación y de la función de los receptores alfa-adrenérgicos y colinérgicos muscarínicos. Efecto de la Toxina Pertussis".

En la presente tesis se incluyen cuatro trabajos en los que se aborda el estudio de la función y regulación de los receptores colinérgicos muscarínicos y alfa-adrenérgicos (Boyer J.L., García A., Becedas C. and García-Cáceres J.O., J. Biol. Chem. 257: 8872-8876, 1982; Boyer J.L., Martínez-Girón M., Morrey-Cáceres J.A., Pastori G., Becedas C., and García-Cáceres J.O. Life Sci., (enviada a publicación, 1983); Boyer J.L., Martínez-Girón M., Morrey-Cáceres J.O., Becedas C., and García-Cáceres, J.O. Eur. J. Pharmacol. (enviada a publicación, 1983); Boyer J.L., Martínez-Girón M., Morrey-Cáceres, J.O., Becedas C., and García-Cáceres, J.O. Biochim. Biophys. Res. Commun. 104:172-177, 1982).

Previamente hemos informado que en la rate la administración in vivo de la toxina pertussis produce un incremento en la frecuencia cardíaca. En el presente estudio, se demuestra que este efecto es producido por la inhibición de la actividad parasimpática del corazón, debido a un bloqueo en la acción de los receptores colinérgicos muscarínicos.

La administración de la toxina pertussis inhibe la bradicardia inducida por la estimulación eléctrica del seno, y bloquea la disminución de la actividad de la adenilato ciclasa producida por la estimulación del receptor colinérgico muscarínico en membranas aisladas del corazón.

El tratamiento con la toxina pertussis, mediante la ADP-ribosilación de la proteína M1, produjo una disminución en el estado de afinidad para agonistas de los receptores alfa-adrenérgicos del riñón, y de los receptores colinérgicos muscarínicos del corazón. Esta disminución fue producida por un cambio en la proporción de sitios en alta y baja afinidad, hacia la conformación de baja afinidad.

En la regulación del estado de afinidad de los receptores alfa-adrenérgicos, cuyo mecanismo de transducción no involucra a la adenilato ciclasa, participa una proteína reguladora dependiente de nucleótidos de guanina, que es insensible a la toxina pertussis, por lo que se sugiere que la modulación del estado de afinidad de los receptores alfa- y alfa-adrenérgicos se ejerce a través de entidades moleculares diferentes.

En el presente trabajo se demuestra la presencia de un mecanismo de regulación cruzada del estado de afinidad para agonistas y antagonistas de los receptores colinérgicos muscarínicos del corazón de la rata. Los efectos de la toxina pertussis observados en el presente estudio, sugieren que esta modulación cruzada se realiza a través de la proteína reguladora M1.

Finalmente, se estudian los efectos de los nucleótidos de guanina sobre la afinidad de unión de los agonistas y antagonistas de los receptores colinérgicos muscarínicos. Los nucleótidos de guanina disminuyen el estado de afinidad del receptor colinérgico muscarínico para agonistas, como ha sido informado por un gran número de investigadores. Sobre la afinidad

de unión para los antagonistas, observamos dos efectos de los nucleótidos de guanina: 1) un aumento en la afinidad del receptor (independiente de la ocupación) y 2) la inducción de cooperatividad positiva en la unión de antagonistas (dependiente de la ocupación del receptor).

ABSTRACT

"Study of the regulation and function of alpha-adrenergic and muscarinic cholinergic receptors. Effect of pertussis toxin".

The present thesis, included four separate manuscripts, aimed to study the function and regulation of the muscarinic cholinergic and the alpha-adrenergic receptors (Cayón, J.L., García O., Rosado G., and García Gilón J.A. J. Biol. Chem. 258, 9976-9979, 1984; Boyer J.L., Martínez-Giráldez M., Manroy-Góchez J.O., Restello G., Rosado G., and García Gilón J.A. Life Sci. submitted 1985; Cayón J.L., Martínez-Giráldez M., Manroy-Góchez J.O., Rosado G. and García Gilón J.A. Eur. J. Pharmacol. submitted 1986; Boyer, J.L., Martínez-Giráldez M., Manroy-Góchez J.O., Rosado G., and García Gilón J.A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987, 172-177, 1987).

Previously we have reported that pertussis toxin administration to rats induces persistent tachycardia. In the present study it is shown that the positive chronotropic effect of pertussis toxin is due to an inhibition of the parasympathetic activity of the heart, which is produced by the blockade in the action of heart muscarinic cholinergic receptors.

Pertussis toxin-treatment inhibited the decrease in heart rate due to electrical stimulation of the right vagus, and concomitantly an impaired modulation of adenylate cyclase activity induced by cholinergic muscarinic agonists.

Pertussis toxin-treatment significantly decreased the affinity for agonists of renal alpha-adrenergic and heart

muscarninic cholinergic receptors. This decrease in the agonist binding affinity was due to a shift in the proportion of sites in high and low-affinity states for agonists towards the low affinity conformation.

It was observed that agonist binding affinity of alpha₁-adrenergic receptors (which are not coupled to the adenylyl cyclase) is modulated by a guanine nucleotide regulatory protein, which is insensitive to the action of pertussis toxin. This data suggest that the modulation of alpha₁ and alpha₂-adrenoreceptors by guanine nucleotides is exerted through different molecular entities.

In the present study the presence of a reciprocal modulation in the agonist and antagonist binding of the cholinergic muscarinic receptors from the rat heart is demonstrated. The effects of pertussis toxin treatment seen in the present study suggest that this modulation appears to reflect the interaction of agonist and antagonist occupied receptors with the guanine nucleotide regulatory protein, G_i.

Finally, the effects of guanine nucleotides on the agonist and antagonist binding of heart muscarinic cholinergic receptors were studied. Guanine nucleotides, decreased receptor affinity for agonists as it was previously reported by several groups. The analysis of the antagonist binding studies, indicates that guanine nucleotides produced two effects: 1) an increase in the affinity for the antagonist (independent of receptor occupancy); and 2) the induction of positive cooperativity in the binding of ³H-ACh (dependent of receptor occupancy).

7. INTRODUCCION

Una gran variedad de hormonas, neurotransmisores y autocorridos inician sus efectos bioquímicos y fisiológicos, mediante su interacción con estructuras receptoras específicas que se localizan en la membrana plasmática de sus células blancas. Entre éstas, se incluyen los receptores para los catecolaminas adrenérgicas y para la histamina, que serán motivo del presente trabajo.

Las uniones simpáticas o catecolaminas ejercen en el organismo una gran variedad de funciones que son mediadas por su interacción con receptores específicos, localizados en la parte externa de la membrana plasmática.

Obiquist (1) recientemente clasificó a las acciones mediadas por las catecolaminas en dos grupos: efectos alfa y efectos beta adrenérgicos. La base para esta clasificación fue el orden de potencia relativa observado en una serie de agonistas adrenérgicos sobre distintos modelos biológicos. En las respuestas dependiente beta adrenérgicas, tales como el trastornamiento positivo del corazón, el isoproterenol es más potente que la epinefrina, la cual a su vez es más potente (o equipotente) que la norepinefrina. En las respuestas tipo adrenérgicas tales como la contracción del músculo liso, la epinefrina es generalmente más potente, seguida por la norepinefrina, siendo el isoproterenol el menos potente de los tres compuestos.

En la actualidad se han identificado dos subtipos de receptores alfa y dos de beta adrenérgicos, que han sido

denominados como alfa₁ y alfa₂, beta₁ y beta₂ adrenérgicos; los receptores beta₁ y beta₂ adrenérgicos, difieren en su afinidad relativa por la epinefrina y la norepinefrina (2). En los receptores beta₁ adrenérgicos, como los localizados en el corazón y en el tejido adiposo, la epinefrina y la norepinefrina parecen ser igualmente potentes, mientras que en los receptores beta₂ adrenérgicos como los presentes en el músculo liso, generalmente la epinefrina es cuando menos 10 veces más potente que la norepinefrina.

Existen también compuestos antagonistas de los receptores beta adrenérgicos, como el propranolol, que es el prototipo de este grupo y que no muestra selectividad alguna por los dos subtipos de receptores beta₁, mientras que otros compuestos, como el pindolol y el butirofeno, presentan selectividad por los receptores beta₁ y beta₂ respectivamente (3,4).

Los receptores alfa adrenérgicos, son los receptores postsinápticos típicos responsables, por acción, de la contracción del músculo liso. Además de estos receptores existe otro subtipo de receptor alfa, cuya presencia fue sugerida inicialmente, basándose en los resultados fisiológicos, que señalaban que las catecolaminas, interactuando con estructuras específicas en las terminaciones nerviosas presinápticas, producen un efecto autorregulatorio sobre su propia liberación (5). Algunos compuestos poseen una potencia considerablemente mayor sobre este clase de receptores, que la exhibida por los mediadores de la clásica respuesta alfa adrenérgica señalada anteriormente (6). Algunos ejemplos de tales compuestos son la

gabombina y la clonidina, un antagonista, y un agonista adrenérgicos respectivamente (8). De acuerdo con estas características de selectividad se denominó inicialmente a este tipo de receptores como alfa o "presinápticos", sin embargo, posteriormente se han identificado receptores con estas mismas características de selectividad en sitios postsinápticos, por lo que la denominación utilizada en la actualidad está basada fundamentalmente en la especificidad farmacológica, más que en su localización "anatómica" (7). Un ejemplo de receptor postsináptico con características alfa adrenérgicas es el encontrado en el músculo liso vascular y en las plaquetas de diferentes especies.

El desarrollo de los métodos de unión de radioligandos específicos, ha permitido la identificación, cuantificación de estos receptores y ha contribuido en forma muy importante en la clasificación, y comprensión de las relaciones e interacciones de los cuales la interacción ligando-receptor adrenérgico surge de acciones bioquímicas y fisiológicas. Además, estos métodos han permitido establecer una correlación entre las propiedades farmacológicas y las propiedades bioquímicas o fisiológicas inducidas por la estimulación de estos receptores (9).

Los avances recientes en la caracterización de los receptores adrenérgicos han llevado a la identificación y purificación de los 4 subtipos de receptores. Para este fin, ha sido muy relevante el papel que han jugado los diferentes enfoques metodológicos aplicados al estudio de su estructura y función, tales como la cromatografía de afinidad (10-11) el marcado por fotoafinidad (12-14) y el empleo de los anticuerpos

necesarios (15-16).

Recientemente se han desarrollado compuestos con alta afinidad y especificidad por los diferentes subtipos de receptores, los que acoplados a un soporte de soporte, han permitido purificar, con procedimientos relativamente sencillos y con altas rendimientos a los varios subtipos de receptores adrenérgicos (16, 17-18).

La visualización in situ de los diferentes subtipos de receptores es muy difícil, debido a que su concentración en la membrana plasmática es muy baja. Sin embargo, la utilización de marcadores por fluorescencia le han hecho posible (19, 20-21). Estos marcadores, para poder ser utilizados en la caracterización del receptor, deben reunir las siguientes condiciones: a) poseer alta afinidad y selectividad por el sitio de unión del receptor; b) poder ser marcados con radioisótopos, (fundamentalmente ^{125}I) para obtener compuestos con alta actividad específica; y c) poseer un grupo químico reactivo, capaz de incorporarse a la cadena polipeptídica del receptor después de ser activado por la luz.

Entre los marcadores desarrollados recientemente para identificar a los receptores beta adrenérgicos se encuentran el noradrenalina [^{125}I]-(debenzyl)decanoil (19), [^{125}I]-(para-oxidobenzoyl)decanoil (21) y [^{125}I]-(para-oxidobenzoyl)decanoil (22), el [^{125}I]-(para-oxidobenzoyl)propanoic acid (23,24) para los alfa₁ y la clonidine p-iodobenzoate (25) y [^{125}I]-(para-oxidobenzoyl)decanoil (17) para identificar a los receptores alfa₂; este último compuesto es un antagonista irreversible que se une covalentemente al receptor, y

ha sido de gran utilidad en la identificación de los receptores alfa-adrenérgicos.

La información anterior, muestra que la interacción entre la inmunología y la bioquímica en el estudio de los receptores ha tenido un papel muy importante en el avance de los conocimientos al respecto, y ha permitido la purificación, caracterización fisiológica de un gran número de estas moléculas, gracias al desarrollo de anticuerpos monoclonales anti-receptor, y por el descubrimiento de su estructura por especificación para diferentes receptores como los beta-adrenérgicos (23).

Por otro lado, la acetilcolina es uno de los principales neurotransmisores del sistema nervioso central y periférico. En 1914 Dale (24), propone clasificar acciones de la acetilcolina en dos grandes grupos: 1, acciones muscarínicas y 2, acciones nicotínicas. Las acciones muscarínicas de la acetilcolina son mimetizadas por la muscarina con similitud durante de los tiempos del género (mamífero), y se observan como los resultados de la estimulación de los nervios parasimpáticos de la pupila, las glándulas salivales, el corazón, los bronquios, el intestino y la vejiga urinaria. Las acciones nicotínicas son las acciones colinérgicas mimetizadas por la nicotina e incluyen el efecto excitatorio sobre la transmisión ganglionar y la placa neuromuscular.

En la actualidad, sabemos que existen dos tipos de receptores colinérgicos, los receptores nicotínicos, localizados en los ganglios simpáticos y en la placa neuromuscular, y los receptores muscarínicos localizados en diferentes regiones del

sistema nervioso central y de la periferia, como en el norandr, el músculo liso vascular y visceral, y en las glándulas endocrinas y exocrinas (22).

Recientemente se han logrado grandes avances en el conocimiento de la estructura y función del receptor colinérgico nicotínico, gracias a la disponibilidad de un sustrato rico en receptores de este tipo: el órgano eléctrico del Torpedo californicum (23).

En el estudio de los receptores muscarínicos, se han empleado una gran variedad de estrategias experimentales, que abarcan los campos de la fisiología, la electrofisiología, la farmacología, la inmunología y la bioquímica.

Al analizar las acciones muscarínicas de la acetilcolina, se observa una gran heterogeneidad en el tipo de respuestas; la estimulación colinérgica muscarínica puede ser tanto excitatoria como inhibitoria, por ejemplo: en los centros corticales del hipocampo y en neurones simpáticas la acetilcolina puede producir hiperpolarización por incrementar la resistencia al flujo de potasio a través de la membrana, mientras que en el tejido cardíaco produce hiperpolarización por incrementar la conductancia para el potasio (24). Por otro parte, se ha observado que estimula la contractión intestinal (25), y relaja el músculo liso vascular (27,28).

Existen numerosas datos experimentales que sugieren heterogeneidad en los receptores muscarínicos, y que estos se podrían clasificar en el menos en tres subtipos diferentes (29-30). Sin embargo, sus características exactas y su

distribución en los tejidos no han sido definidas plenamente, como ha sido el caso para los receptores adrenérgicos. Esto se debe fundamentalmente a la pobre selectividad de los agonistas y antagonistas muscarínicos. En base a estudios de unión con radioligandos, se ha sugerido que la Pirazepina, un antagonista muscarínico, es capaz de distinguir entre diferentes subtipos de receptores muscarínicos del cerebro y tejidos periféricos (41), sin embargo, mediante estudios farmacológicos, empleando preparaciones aisladas, no se han podido demostrar en algunos casos tales diferencias (42,43). Otros estudios sugieren la existencia de heterogeneidad funcional de los receptores muscarínicos del músculo liso intestinal, tanto por criterios farmacológicos (44) como electrofisiológicos (45); en este caso, los estudios de unión de radioligandos al receptor indican que existe sólo una clase de receptores en esta tejido (46). Es muy probable que la causa de las discrepancias entre los resultados farmacológicos y bioquímicos obedezca a que se ha tratado de subclasificar a los receptores, basándose en la selectividad observada por sólo un compuesto (pirazepina), de tal forma que es necesario disponer de nuevas fármacos, que presenten mayor selectividad por los diferentes subtipos de receptores muscarínicos, así como lograr mayores avances en la caracterización molecular de los receptores en los diferentes tejidos.

Se ha descrito una gran variedad de eventos bioquímicos originados por la acción de agentes muscarínicos, que podrían dar cuenta de las acciones de la acetilcolina. Así, se ha observado que la acetilcolina disminuye la actividad de la adenilato

ciclase (47), y activo a la guanilato ciclase (48) y a la fosfodiesterasa del AMPcíclico (49). En membranas de vesículas vesiculares, estos agentes causan despolimerización por el cierre de canales de potasio. Mientras que en células intactas la apertura de canales de potasio, en vesículas aisladas la acción de los receptores muscarínicos está acoplada a la apertura de canales para calcio (50) y al igual que otras hormonas y neurotransmisores, puede incrementar la hidrólisis de fosfatidil inositol de la membrana y la movilización de calcio intracelular (50,51). Tampoco está claro en la actualidad, si estos mecanismos afectan entre sí individualmente a distintas subpoblaciones de receptores muscarínicos, o si al menos algunos de ellos son la consecuencia de un evento inicial común.

Estructura.

Recientemente se han realizado varias intentos de purificación del receptor colinérgico muscarínico, empleando diversos enfoques metodológicos. El receptor muscarínico se ha solubilizado de la membrana conservando sus características de reconocimiento de ligandos (52-54), y su peso molecular se ha estimado por diferentes métodos (55-57) (Tabla I). No obstante que la gran cantidad de receptores en todas las células estudiadas ha sido un obstáculo importante de los intentos de purificación recientemente se han desarrollado métodos empleando cromatografía de afinidad (58), por los que se han obtenido preparaciones puras del receptor (aproximadamente 100,000 veces)

(42) que conservan en su totalidad las características de unión de ligandos observadas en las membranas intactas. Estas preparaciones han demostrado ser estables, y serán de gran utilidad en el estudio de la estructura y regulación de los receptores colinérgicos muscarínicos en los próximos años. El peso molecular del receptor colinérgico muscarínico, empleando métodos diferenciales, tales como electroforesis en gelos de poliacrilamida (50), radiografía con sustancias específicas (51) y métodos hidrofóricos (52), coinciden en señalar que el sitio de unión de la acetilcolina reside en una proteína de aproximadamente 80,000 Da.

Mediante el estudio de inactivación por radiación (Targel *et al*), Montier (53) encontró que en el cerebro del humano, de la rata y en el feto de ratón, el receptor muscarínico tiene un peso molecular promedio de 70,000 ± 62,000 Da. Estos datos sugieren que la proteína purificada por otros investigadores (54-57) se corresponde a la subunidad del receptor, sino que esta está constituida por una proteína monomérica de aproximadamente 80,000 Da.

Preparaciones relativamente puras del receptor colinérgico muscarínico de diversas especies y tejidos, se han sometido a estudios de postulista controlada obteniéndose fragmentos peptídicos similares en todas las preparaciones estudiadas (58), lo que sugiere que se trata de proteínas estructuralmente relacionadas, aunque no se pueda descartar la posibilidad de microheterogeneidad entre ellas.

Utilizando anticuerpos monoclonales, Montier y colaboradores (49) han detectado una posible homología estructural entre los

receptores colinérgicos muscarínicos y los receptores alfa adrenérgicos, lo que constituye un punto de apoyo para la teoría de la localización de los receptores para neurotransmisores propuesta por otros investigadores (15).

Recientemente, el grupo de Wentz y colaboradores (16) publicó el primer estudio de reconstitución del receptor colinérgico muscarínico. El receptor fue purificado del corazón de perro, e incorporado en membranas de eritrocitos humanos, que carecen de receptores muscarínicos, pero sí poseen los proteínes reguladoras que propinan a los receptores con la subunidad β_2 (Sternweis y Nathanson, 1977). En un estudio más reciente, reconstituyeron el receptor muscarínico purificado de serpiente de la loro, con proteínes reguladoras dependientes de GTP purificadas de la misma fuente. Estos estudios de reconstitución que se inician ahora para el receptor colinérgico muscarínico, así como gran utilidad en el estudio de la estructura, función y regulación, como lo hizo el caso para los receptores colinérgicos nicotínicos (17) y los receptores beta adrenérgicos (18,19).

En la tabla No. 1, se presentan las principales características moleculares de los receptores adrenérgicos y colinérgicos muscarínicos.

TABLA I

ALGUNAS CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LOS RECEPTORES ADRENERGICOS Y COLINERGICOS MUSCARINICOS Y EL EQUIPO DE ANTICUERPOS EN EL ESTUDIO DE SU ESTRUCTURA

CARACTERÍSTICA	RECEPTORES ADRENERGICOS				Receptor Muscarinico*
	Alfa ₁	Alfa ₂	Beta ₁	Beta ₂	
Ligando Endógeno	Epi-NE	Epi-NE	Epi-NE	Epi-NE	Acetilcolina
PM (Hidrodinámico)	83 K (16)		45 K (16)	93 K (16)	64 K (27)
P.M. (Electroforesis)	95 K (29)	81 K (17)	65-73 K (15)	55-53 K (23)	88 K (16)
Punto Isoeléctrico	3.9 (28)		5.5 (28)	4.2 (28)	4.0 (23)
Inactivación por Radiación (Target size)	160 K (16)	169 K (30)	90 K (31)	115 K (16)	80 K (16)
Estructura	Dímero		Monómero?	Dímero ₂	Monómero
Anticuerpos Anti-receptor	Monoclonal (16)		Monoclonal (16)	Monoclonal Autoanticuerpo (16)	Monoclonal (16)
Reactividad Cruzada	Específico (16) solo para alfa ₁		Si (16)	50-100% solo entre B ₂ diferentes tejidos	Específico (16) para todos los receptores muscarinicos en diferentes tejidos.

EPI - Epinefrina; NE, Norepinefrina; P.M., Peso molecular K^x 10³

a, No se ha observado diferencias entre cerebro, corazón y músculo liso de rata, cobayo, perro y humano.

Cuando un mensajero químico (hormona, neurotransmisor, o autacoides) alcanza a su célula blanco e interactúa con su receptor membranal, se genera una respuesta a la información contenida en tal mensaje químico, que muy frecuentemente tiene lugar en sitios intracelulares (por ejemplo, la modulación de la actividad catalítica de la actividad de enzimas citoplasmáticas). Por este modo, naturalmente se considera que la información codificada en los mensajeros químicos debe ser traducida a un lenguaje que pueda ser utilizado en el interior de la célula. Generalmente, esta traducción da lugar a la generación de un segundo mensajero intracelular encargado de activar en la célula, los cuantos que conducen a la respuesta final (secretada, contractil, metabólica o conductiva). Así, actualmente se conoce como mecanismo de transducción a la serie de eventos involucrados dando que un mensaje interactúa con su receptor en la membrana, hasta que se genera el segundo mensajero intracelular.

El mecanismo de transducción hormonal más conocida y el primero que fue descrito es el de la activación de la enzima adenilato ciclasa, que da lugar a la síntesis en la formación de GMP cíclico, que es el segundo mensajero de muchas hormonas (60). Este mecanismo de transducción ocurre durante la activación de los dos subtipos de receptores beta (B₁ y B₂) (3, 38) así como de otros receptores como los de glucagón (42), la hormona paratiroidea (43), histamina (44) (70), etc.

Los receptores alfa-adrenérgicos, y un subtipo de los

receptores colinérgicos muscarínicos, transducen a través de un mecanismo que conduce a una disminución de la concentración de GMP cíclico intracelular, mediante la inhibición de la actividad de la enzima adenilato ciclasa (77).

Existen además otras recepciones que inhiben la actividad de la adenilato ciclasa, como las receptores β -1 dopamina (78), un subtipo de adrenergico (79), ácido arabinico, prostaglandinas en el tejido adiposo (76), etc.

Los receptores β -1, adrenergicos y un subtipo de receptores colinérgicos muscarínicos transducen su señal por un mecanismo que involucra a la disminución de calcio intracelular, incrementando la concentración libre de este ion en el citoplasma. Este incremento involucra la liberación del trifosfatidilinositol de la membrana. Este mecanismo de transducción también es empleado por otros receptores tales como vasopresina, histamina y angiotensina II (71, 72-73).

ACTIVACION DE LA ENZIMA ADENILATO CICLASA

El sistema adenilato ciclasa, es un sistema enzimático localizado en la membrana plasmática, que cataliza la formación de GMP cíclico a partir de ATP en respuesta a hormonas extracelulares, neurotransmisores y moduladores celulares. El sistema está constituido por un complejo formado por la membrana por tres componentes: el receptor (R), una proteína reguladora dependiente de suscitador de guanine (GN) y la unidad catalítica de la adenilato ciclasa (C).

En la figura 1 se muestran los eventos involucrados en la

activación de la enzima adenilato ciclasa; en este ciclo, la interacción de P y C es mediada por una proteína reguladora dependiente de nucleótidos de purinas, denominada Na (94).

En ausencia de agonistas, la proteína Na se encuentra disociada de P y de C, y el GDP está unido en el sitio de nucleótidos de la proteína Na. La ocupación del receptor por la hormona induce la formación de un complejo ternario MR,Na-GDP en el cual el receptor expresa un estado de alta afinidad para agonistas (95), así como una reacción de intercambio de GDP por GTP (95). Esta reacción se puede considerar como la reacción de encendido del sistema, ya que el complejo Na-GTP es la forma activa que induce la estimulación de C después de disociarse del receptor. En estas condiciones el receptor pasa a un estado de baja afinidad para agonistas (96).

La activación de C se mantiene hasta que el GTP es hidrolizado por la misma proteína Na, que posee actividad de GTPasa (97), convirtiéndose a C en su forma inactiva y dejando a Na con GDP unido. Se puede considerar a la reacción de hidrólisis de GTP como la reacción de apagado del sistema, en estas condiciones, es posible iniciar otro ciclo de activación.

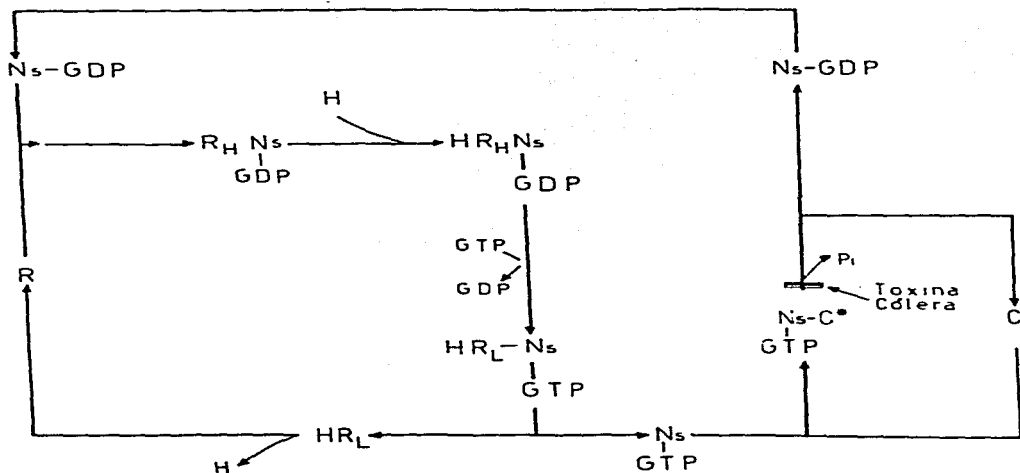


Figura 1. Modelo del Ciclo de Activación de la Adenilato Ciclasa. H, Hormona; N_s , proteína reguladora dependiente de nucleótidos de guanina que participa en la estimulación de la adenilato ciclasa; C, subunidad catalítica de la adenilato ciclasa; C^* , forma activa de la subunidad catalítica; R, receptor; R_H , configuración de alta afinidad para agonistas; R_L , configuración de baja afinidad para agonistas (para mayores detalles véase el texto).

INHIBICIÓN DE LA ADENILATO CICLASA

El ciclo de inhibición del sistema de la adenilato ciclasa es muy similar al de su activación (Figura 2), en la inhibición participa una proteína reguladora diferente a la proteína G_i que ha sido denominada G_{i2} (26). A diferencia del ciclo de activación, la forma activa (G_{i2}^{*}) por este ciclo es cuando la actividad enzimática de G_{i2} está inhibida, y es por lo tanto que disminuyen los niveles de cAMP.

En la fig. 3 se muestra un modelo de los componentes que participan en la estimulación e inhibición de la adenilato ciclasa.

Las proteínas han contribuido en forma muy importante en el estudio de los mecanismos de transducción de receptores acoplados a la inhibición y a la estimulación de la adenilato ciclasa: la toxina del cólera, que interfiere selectivamente con el mecanismo de activación de la adenilato ciclasa, y la toxina pertussis que bloquea los receptores inhibitorios de la adenilato ciclasa inducidos por activación de receptores.

TOXINA DEL CÓLERA

La toxina del cólera es una enterotoxina producida por el bacilo *Vibrio cholerae*, y es la responsable del cuadro clínico (diarrea) de la enfermedad del cólera (27).

La toxina del cólera es una proteína oligomérica cuyo peso molecular es de aproximadamente 24,000 Da., está formada por dos componentes A y B. El componente B es un octómero formado por cinco subunidades idénticas (28) (11,000 Da.) (28), a través de las cuales la toxina se une específicamente a

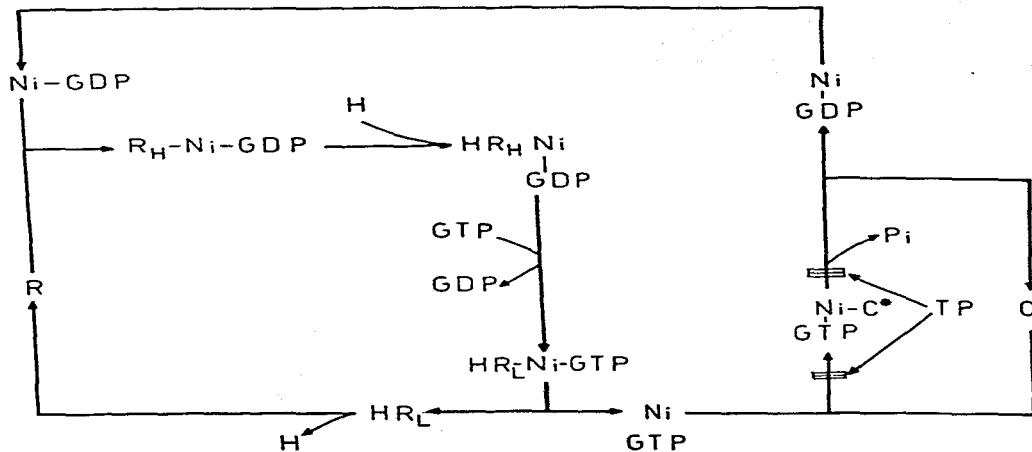


Figura 2. Modelo del Ciclo de Inhibición de la adenilato ciclasa. H, hormona; Ni, proteína reguladora dependiente de nucleótidos de guanina que participa en la inhibición de la adenilato ciclasa; C, subunidad catalítica de la adenilato ciclasa; C*, forma activa de la subunidad catalítica; R, receptor; R_H, configuración de alta afinidad para agonistas; R_L, configuración de baja afinidad para agonistas; T.P. toxina pertussis.

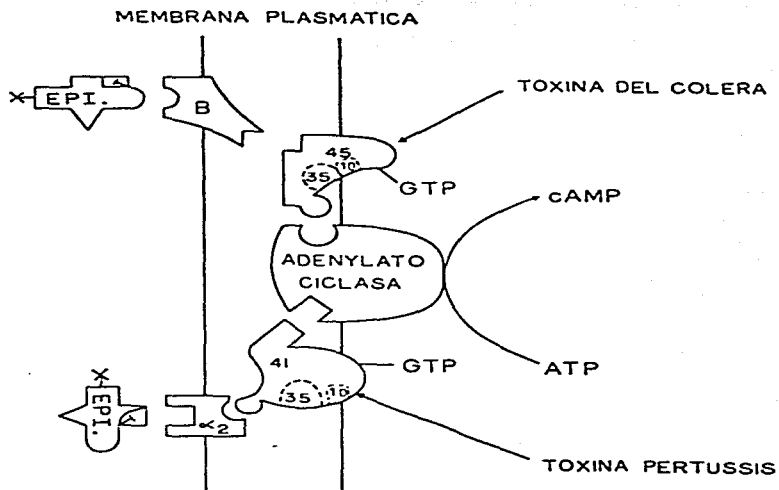


Figura 3. Modelo de los componentes que participan en la estimulación e inhibición hormonal de la adenilato ciclasa. Epi, epinefrina; 45, subunidad alfa de la proteína N_s ; 41, subunidad alfa de la proteína N_i ; 35, subunidad Beta (P.M. 35,000 Da) de las proteínas N_s y N_i ; 10, subunidad gama (P.M. 10,000 DA) de las proteínas N_s y N_i .

membranas plasmáticas (20a) presentes en la membrana plasmática de la mayoría de las células eucarióticas. Este componente no posee actividad tóxica (22, 23). El componente A lo constituyen 2 proteínas diferentes: la proteína A₁ de aproximadamente 24,000 Da, y la proteína A₂ de 7,000 Da, estas subunidades están enlazadas entre sí por un puente disulfuro. El componente B de la toxina se le une a la subunidad A₁ por la parte no es tóxica para la célula intacta (22).

El mecanismo de acción propuesta para la toxina del cólera es el siguiente: la toxina a través del componente B se une a la membrana celular interactuando con los gangliosidos G_{m1}, esta interacción produce cambios en la estructura proteínica y lipídica de la membrana, que permiten, que el componente A se interne en la célula (24), existen evidencias que sugieren la existencia de una proteína asociada con el componente A de la toxina (25) y que actúa dentro de la membrana, mediante la acción de una hidrolasidrolasa membranal, se libera la subunidad A₁ del componente A (26), que es la subunidad activa de la toxina.

Se ha demostrado que la toxina del cólera produce un estado de estimulación permanente de la adenilato ciclasa, mediante la GTP-ribosilación de la proteína No (27, 28).

Actualmente, la proteína No ha sido purificada a homogeneidad y se ha demostrado que ella es el sustrato de la toxina del cólera (29). Se ha comprobado también que la ADP ribosilación de la proteína No por la toxina del cólera produce una inhibición de la actividad de GTPasa de esta proteína (30, 31) (Figura 1).

El conocimiento de los efectos y del mecanismo de acción de la toxina del edema, a sido de gran utilidad en la caracterización de los eventos moleculares que participan en el proceso de saturación de la adenilato ciclasa.

TOXINA PERTUSSIS.

El enfoque de los estudios de la toxina pertussis en relación al sistema hormonal adrenérgico clásico, se inició al principio de la presente década (1971). Trasluciendo, se había observado que la administración de la toxina pertussis a ratones produce hiperactividad a la histamina (1971); posteriormente, se describe que la toxina pertussis potencia de la liberación de insulina producida por isletos beta adrenérgicos (1972). En 1973, el grupo de M. y colaboradores, purifican del suero de ratones de *Rattus norvegicus* una proteína de peso molecular de 77,000 Da, que es capaz de reproducir los efectos de la suspensión de bacterias (*Bordetella pertussis*) y que denominan "Toxin Pertussis Purified" (1973), debido a que este protótipo de toxina de inducir el aumento en la liberación de insulina basal y estimada por diferentes receptores (1973). En 1976, este grupo de investigadores observó que los efectos de la toxina pertussis sobre la liberación de insulina son altamente dependientes de la presencia de insulina extracelular (1976), en este mismo año, proponen que la liberación de insulina inducida por la toxina pertussis es mediada por la saturación de receptores para el β_2 (1976). Se sabe que la liberación de insulina de los isletos pancreáticos se inhibe por la estimulación de los receptores adrenérgicos (α_1 y α_2) y aumenta por la estimulación de los receptores beta-

adrenérgicas (aumento de AMPc) (1977). En un trabajo realizado en 1981 por García-Gil et al. (71), se demuestra que la acción perivascular disminuye la actividad de los enzimas alfa-adrenérgicos, adrenérgicos y prostaglandinas en el tejido adiposo del hígado, a la vez que aumenta la lipólisis (76, 1981), propone que la acción perivascular bloquea la transferencia de la información inhibitoria del receptor a la adenilato ciclase (74).

El efecto de la toxina perivascular no es exclusivo para las receptores alfa-adrenérgicos, sino que también se observa para prostaglandinas, adrenérgicos y beta-adrenérgicos en el tejido adiposo (71); para epinefrina y adrenérgicos en el corazón (108); para epinefrina en células de mastocitos plasmocitomas (109); músculo liso intestinal (106); para agonistas dopaminérgicos en la hipofisis (72), etc. Estos datos sugieren que los diferentes receptores, cuya estimulación produce inhibición de la adenilato ciclase, introducen la señal a través de mecanismos celulares comunes presentes en los diferentes estímulos celulares.

En 1982, Miledi y Mui (107) muestran que las membranas de células C6 glioma, tratadas con IBMX, se observan en forma inmediata un aumento de la actividad de la adenilato ciclasa dependiente de GTP, que correlaciona estrechamente con la incorporación de GDP ribosa a sus protótipos. La membrana de 41,000 Da. (109, 1982). En otros trabajos se muestra además que la proteína GDP-ribosilada por la toxina perivascular es diferente a la GDP-ribosilada por la toxina del alfiler.

El mismo grupo de Mui y colaboradores, al estudiar desde el punto de vista estructural a la toxina perivascular (110), proponen que la estructura de la toxina corresponde al modelo A-D propuesto

Para algunas de las bacterias como la toxina del cólera (90), la toxina pertussis está formada por 5 subunidades diferentes; S1, S2, S3, S4, y S5, en una simetría de 1:1:1:1:1 respectivamente, los pesos moleculares de las subunidades son: S1, 300 000 Da; S2, 300 000 Da; S3, 300 000 Da; S4, 11 700 Da; S5, 2 300 Da. (5) El peso molecular de la toxina por centrifugación al equilibrio es de 117,000 Da (110).

De acuerdo con el modelo de B, el protímero A formado por S1 es el componente con actividad biológica (110), mientras que el oligómero B, formado por dos dímeros: S2 S3 y S4 y S5, unido entre sí mediante S5 por interacciones no covalentes, constituye el componente a través del cual la toxina interacciona con la membrana y permite que el protímero A sea transportado al interior de la célula y ejerza su actividad biológica (110,111). Por lo tanto, el componente B de la toxina es activo en células intactas únicamente cuando está unido al oligómero B, mientras que los fragmentos de membrana se unen en su forma libre.

La interacción de la toxina con la membrana, y la internalización del protímero A, se produce al periodo de latencia observada entre la administración de la toxina y una actividad biológica cuando es administrada tanto in vivo como in vitro en células intactas (76, 102, 103, 112-117). En fragmentos de membranas tratadas con toxina pertussis previamente activada con DTT y uraco, (para dissociar el protímero B), los efectos son inmediatos (102, 112).

Recientemente se demostró que la subunidad S1 posee dos actividades enzimáticas: NAD-glicohidrolasa y ADP-

-ribosiltransferasa, las cuales son activadas por agentes reductores de grupos sulfohidrilo (111, 117). Se piensa que esta activación está asociada con la reducción de grupos disulfuro intermoleculares presentes en la actividad catalítica de la leucina (111, 117).

Más recientemente se ha observado que el tratamiento con la toxina portuensis no modifica la actividad basal de la adenilato ciclasa (125, 112, 113-120). Se ha observado un bloqueo de la actividad de GTPasa de la proteína NI en diferentes tipos celulares (121-123), asociado al bloqueo de la transducción de la señal inhibitoria del receptor a la adenilato ciclasa.

Los nucleótidos de Guanine (GTP y sus análogos no hidrolizables como el GppNHpp y el GTP γ S), inhiben la actividad de la adenilato ciclasa tanto en condiciones basales, como estimulada por agentes tales como la forskolina (124). El tratamiento con la toxina portuensis bloquea la inhibición producida por GTP (122, 123-125), pero no el efecto inhibitorio producido por los análogos no hidrolizables (112, 122-123).

En otros los estudios de la toxina portuensis, se sugiere que la GppNHpp-inhibición de la proteína NI establece a la proteína acopladora en un estado inactivo, de tal forma que el acoplamiento entre receptores inhibitorios y la adenilato ciclasa está bloqueado. Los datos de inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa inducida por GTP (120, 122-124) bajo tratamiento con toxina portuensis, y la ausencia de efecto de la toxina sobre la actividad basal (107, 112, 113-124) sugieren que la acción de la toxina portuensis pudiera ser ligada también en el acoplamiento funcional entre NI y G. Debido a los efectos

especificidad de la toxina particular sobre la proteína Mi.

La toxina ha sido utilizada como herramienta en la caracterización de algunas proteínas mediante por agentes adénosílicos de este tipo que ocupan el mismo sitio de transducción (70, 74, 100, 104, 110, 114, 115, 116, 120, 122).

Existen evidencias que señalan que los receptores para un gran número de hormonas y neurotransmisores interactúan en la membrana con una familia de proteínas reguladoras (84, 128, 129), y que estas proteínas poseen al menos tres propiedades en común: 1) poseen un sitio colectivo de alta afinidad para GTP, 2) tienen la capacidad para hidrolizar espontáneamente GTP y 3) están compuestas por la unión de tres subunidades diferentes, las de las cuales se nombran al menos en las tres especies estudiadas: α , β y γ . Transducin, esta última, es la proteína reguladora que ocupa el receptor de la luz en la retina (Rodopsina) con la fosforilación de GTP a GTP- γ (102). Existen además evidencias que sugieren la participación de proteínas reguladoras dependientes de nucleótidos de guanine en el acoplamiento de receptores que inducen la activación de calcio intracelular, vía hidrólisis de fosfoinosítido (PIP) y en la disminución de AMPc vía activación de la fosfodiesterasa de AMPc (102); sin embargo, tanto su estructura como su función no son tan bien conocidas en la actualidad como las de α y β . Como se señaló anteriormente, estas proteínas son heterotrímeras, compuestas de subunidades denominadas α , β y γ . Las subunidades β , γ (120, 100, 125, 99 y 10, 99 del respectivamente) parecen ser idénticas en α y β , durante la solubilización y purificación estas proteínas se

comportan como un complejo estable de la forma $\alpha N_s \beta \delta$ y $\alpha N_i \beta \delta$ (122, 123).

Las subunidades α de Ni y Ni₂, las cuales poseen el sitio de unión de nucleótidos de guanine, difieren en su estructura (122, 123, 125). αN_i tiene un peso molecular de 41,000 Da, mientras que para αN_s se han descrito dos formas con pesos de 42-45,000 y 47-52,000 Da. (122, 124, 125). Empleando la técnica de autoradiografía y coloboradores (126), demostraron la existencia de 2 formas de la proteína Ni, con pesos moleculares de 40,000 y 41,000 Da.

La activación de la actividad ciclase parece requerir la disociación del complejo inactivo $\alpha N_s \beta \delta$ y $\alpha N_i \beta \delta$ (122, 123). αN_s en presencia de GTP o de sus análogos no modificables se képes de activar la unidad catalítica de la enzima (122, 123). La inactivación del sistema ocurre mediante la inactivación del GTP, y la reasociación de αN_s con $\beta \delta$ para obtener nuevamente la forma inactiva (122, 125, 127). Las subunidades tales como el receptor, incrementa la liberación de GEF de la forma inactiva, promoviendo la unión de GTP (122, 123).

La interacción de proteínas con receptores que inhiben a la adenilato ciclase, producen la activación de Ni, mediante la disociación de $\alpha N_i \beta \delta$, siendo este último complejo idéntico al obtenido de la disociación de Ni₂ (122, 123, 124, 125). Se piensa que la inhibición de la actividad catalítica de la adenilato ciclase por el resultado de un combinación de los mecanismos (122, 123, 124, 125) primero, la disociación de Ni incrementa la disponibilidad de $\beta \delta$, favoreciendo la asociación de este último con la forma activa de αN_s , desplazando el equilibrio hacia la formación del complejo inactivo $\alpha N_s \beta \delta$ (122, 124, 125). El otro

neurotransmisor parece ser, por un efecto inhibitorio directo de NI sobre la actividad catalítica de la adenilato ciclasa, esta suposición está basada en observaciones realizadas en membranas preparadas de una línea celular derivada de linfoma (Leyel), las cuales son deficientes en Na, en donde se demostró que la adenilato ciclasa es susceptible de inhibición directa a través de NI (119, 120).

De la misma forma como sucede con Na, la actividad de GTPasa de NI es incrementada como resultado de la intervención de agonistas con receptores inhibitorios específicos, por ejemplo NI-GTP en NI-GDP, pasando a la proteína reguladora de la forma activa a la forma inactiva. La reactivación de NI requiere que se efectúe la reacción de intercambio de GDP por GTP, proceso controlado también como en Na por la interacción del receptor con agonistas específicos (140-147).

Las proteínas reguladoras Na p/Na, además de su función en el acoplamiento funcional entre los receptores estimulados e inhibitorios con la adenilato ciclasa, a su vez, evidentemente, también parecen jugar un papel importante en la regulación del estado de actividad del receptor por los agonistas (figuras 1 y 2).

NEUROLOGÍA DE ESFERADILINCOITAL

En 1959, las investigaciones pioneras de Hokin y colaboradores (126), acerca del efecto del calcio de la participación de los fosfolípidos en la respuesta celular a la administración de neurotransmisores. Ellos observaron

primariamente que la fosfatidilcolina de fosfato radiactivo a las fosfolípidos de la membrana por un aumento en respuesta a la administración de epinefrina en células pulmonares; posteriormente el mismo grupo en 1967, demuestra lo mismo para la adrenalina y noradrenalina en la glándula submaxilar del conejo, donde además demuestran que esta respuesta es precedida por la administración de los antagonistas α y β adrenérgicos, dibenzamina (147). En 1970 se demostró en forma retrospectiva que este efecto de los catecolaminas era debido a través de la estimulación de receptores α -adrenérgicos (148, 150).

Posteriormente, las conclusiones aportadas por un grupo alemán de investigadores muestran que la hidrólisis de fosfatidilinositol era un evento crucial en la respuesta celular a la estimulación de una gran variedad de receptores que emplean el Ca^{2+} celular como mensajero intracelular, y en 1975 Robert Mitchell (151) hace formal esta proposición.

En 1966 Ewin y Garavito-Gilman proponen que el cambio de receptores α -adrenérgicos, según se ilustra en el esquema, el aumento de fosfatidilinositol y la movilización de calcio son los receptores α -adrenérgicos, mientras que los receptores β -adrenérgicos ejercen sus acciones mediante la inhibición de la actividad celular (152).

Recientemente se ha demostrado que el fosfolípido hidrolizado en respuesta a la estimulación del receptor es el fosfatidilinositol 1,3-bisfosfato (PIB), que se localiza en la parte interna de la membrana plasmática. El PIB se forma en la membrana mediante la fosforilación esencial del fosfatidilinositol (PI) en las posiciones 1 y 3 del inositol,

esta fosforilación es realizada por Kinases específicas (KES).

La figura 6 muestra la secuencia de eventos involucrados en la síntesis e hidrólisis del PIP₂. La hidrólisis de esta compuesto se realiza a través de la actividad de una fosfolipasa específica, localizada también en la parte interna de la membrana plasmática, cuya actividad es incrementada en respuesta a la actividad del receptor por sus agonistas específicos (KES). Recientemente se ha demostrado que en este proceso de activación de receptores que agotan sus acciones a través de la fosforilación de calcio, participa una proteína reguladora dependiente de calcio de gran peso molecular, probablemente similar a las proteínas M₁ y M₂ (KES).

Parte del trabajo presentado en la tesis (KES), confirma la participación de una proteína dependiente de calcio de gran peso molecular en las acciones de los neurotransmisores y en el primer informe que demuestra que el nivel de fosforilación diferente de la proteína reguladora dependiente de calcio de gran peso molecular está controlado por los neurotransmisores adrenérgicos. Otros trabajos en los que se han observado estas variaciones utilizando métodos de autoradiografía (KES). Los productos de la hidrólisis del PIP₂ son el 1,3-bisfosfoglicerato, y el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃) (KES), los que a su vez también funcionan como sustrato para la activación de PIP₂ (figura 6).

De la comparación de receptores ligados que la concentración de IP₃ es incrementada significativamente en respuesta a la activación de distintos receptores por sus agonistas (KES-KES). El PIP₂ actúa como un cofactor intracelular para calcio, es capaz de producir la fosforilación de este ion a partir de fosfolipos

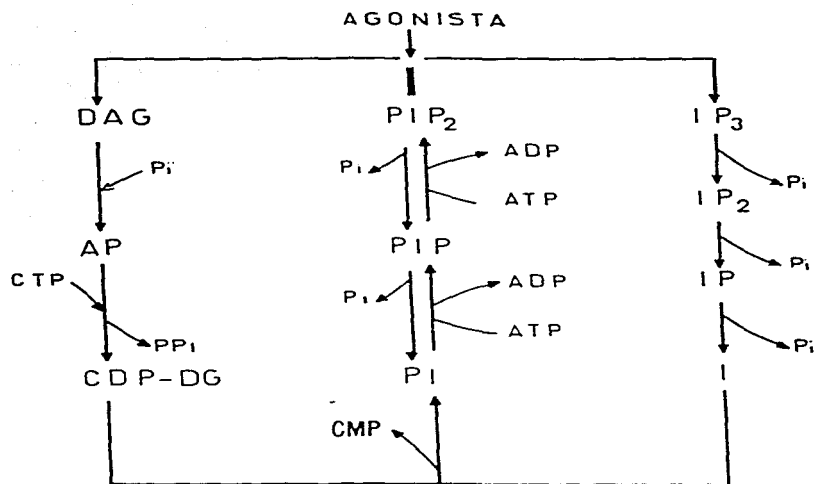


Figura 4. Ciclo de Hidrólisis y Síntesis del Fosfatidilinositol. PI, fosfatidil inositol; PIP, fosfatidilinositol 4-fosfato; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; I, inositol; IP, inositol 1-fosfato; IP₂, inositol 1,4 bifosfato; IP₃, inositol 1,4,5-trifosfato; DAG, diacilglicerol; AP, ácido fosfatídico; CDP-DG, citidina difosfato diacilglicerol; CMP, citidina monofosfato.

intercelulares, existen evidencias de que este depósito pudiera ser principalmente el resultado endoplásmico (176) (Fig. D).

Es interesante considerar que, el otro producto de la hidrólisis del PIP₂, el 1,3-bisglicerol, puede ser considerado como otro segundo mensajero que pervenida en la membrana plasmática se encuentra con las enzimas (actividad cuadruplicada por el grupo de Nishizuka y colaboradores (187)). Esta compuesto es un activador natural de las proteínas kinasa que ha sido demostrada por el grupo N. Los esteres de phorbol (agente por especificidad para todos los tumores cuando se administran junto con sustancias carcinogénicas) han jugado un papel muy importante en el estudio de la participación de la proteína kinasa C, y que estos compuestos poseen un efecto antitumor directo sobre la célula (176-188).

La activación de la proteína kinasa C induce la fosforilación de un gran número de proteínas intracelulares (179, 180), pudiéndolo iniciar por ejemplo una cascada de reacciones intercelulares que produce una respuesta celular (Figura E).

La acción de los efectos citoenergéticos, así como los mediadas por otros tipos de receptores, también sido estudiadas recientemente a la luz de la de calcio intracelular, sin embargo, estudios recientes del grupo de Nishizuka y colaboradores (187), muestran que el incremento en la concentración libre de calcio intercelular y la activación de la proteína kinasa C por la acción del diacilglicerol, pueden ocurrir en forma sinérgica en diferentes tejidos (187).

La proteína kinasa C parece desempeñar un doble papel en la

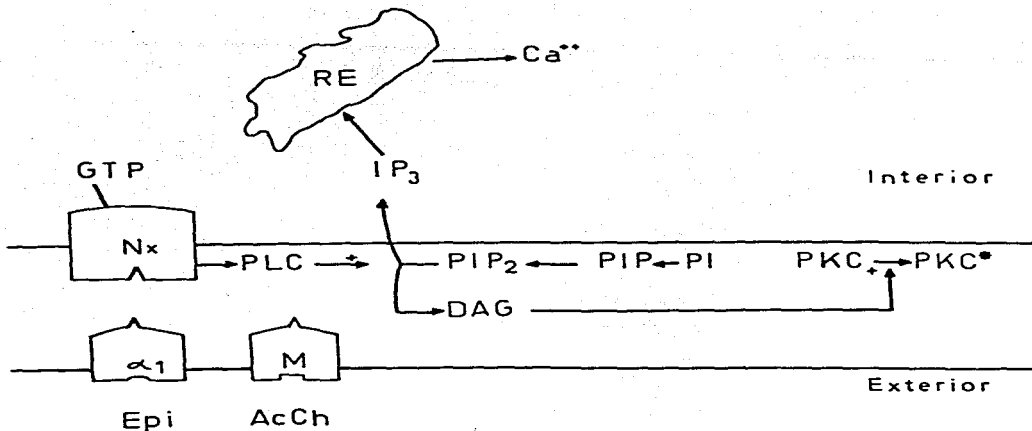


Figura 5. Modelo de los componentes que participan en la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato. Epi, epinefrina; Ach, acetilcolina; α₁, receptor α₁-adrenérgico; M, receptor muscarínico; Nx, proteína reguladora dependiente de nucleótidos de guanina; PLC, fosfolipasa C; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PIP, fosfatidilinositol 4, fosfato; PI, fosfatidil inositol; PKC, proteína kinasa C; PKC*, forma activa de la proteína kinasa C; IP₃, inositol 1,4,5-trifosfato; RE, retículo endoplásmico.

acción de los receptores electrofisiológicos además de los efectos ya señalados, puede jugar un papel regulador que controla la actividad del receptor por las especies Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} . Observaciones más recientes de García-Bilón, col. sugieren que la proteína Ca^{2+} podría tener un papel importante en el proceso de desensibilización de la respuesta electrofisiológica (145, 146).

En los últimos años se han logrado grandes avances en el conocimiento de los mecanismos involucrados en las acciones de receptores que inducen la movilización de calcio intracelular vía cambios de polarizabilidad. Sin embargo, aún quedan muchos aspectos que requieren de estudios adicionales, como son la identidad y papel que tiene la proteína reguladora, dependiendo de la cualidad de estímulo en este tipo de respuestas, y el mecanismo o forma del cual el Ca^{2+} libre se suelta de depósitos intracelulares, así como el modo de depósito mismo mediante la estimulación de un receptor específico localizada en estas estructuras intracelulares y interfiere con intercambiadores de membrana o con algún sistema de transporte especializado como la ATPasa de Ca^{2+} .

II. OBJETIVO DEL ESTUDIO.

El trabajo realizado durante el desarrollo de la presente tesis, tuvo por objetivo abordar el estudio de los receptores alfa adrenérgicos y beta adrenérgicos musculares desde los puntos de vista de su función, y fundamentalmente de regulación por los nucleótidos de purina. Con el empleo de la toxina pertussis en estas agudias, se pretende profundizar en los mecanismos involucrados en la función y regulación de estos receptores, a la vez que se contribuya a la caracterización de las acciones de la toxina pertussis en los diferentes sistemas empleados, debido a la importancia que tiene como herramienta en el estudio de los receptores en general.

Para este fin, se realizaron los siguientes trabajos:

- 1.- Boyer, J.L., García, G., Rosadas, G., and García-Estévez, J.A. (1994) Differential effect of pertussis toxin on the affinity state for agonists of alpha1-adrenergic and alpha2-adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 269, 20761-20768 (Referencia 120).
- 2.- Boyer, J.L., Martínez-Gómez, M., Morroy-Sánchez, J.A., Rosadas, G., Rosado, G., and García-Estévez, J.A. Effect of pertussis toxin on the beta1-muscarinic/cholinergic receptors and their function. *Enviado a publicación Life Sciences*, 1997. (Referencia 121).
- 3.- Boyer, J.L., Martínez-Gómez, M., Morroy-Sánchez, J.A., Rosadas, G. and García-Estévez, J.A. Effect of pertussis toxin on the muscarinic receptor affinity. *Enviado a publicación Eur. J. Pharmacol.* 1994. (Referencia 122).
- 4.- Boyer, J.L., Martínez-Gómez, M., Morroy-Sánchez, J.A.,

Paradis, G., and Garcia-Cardena, J.A. (1983). Guanine Nucleotide-induced positive cooperativity in human liver cholinergic acetylcholinesterase binding. *Electrochim. Biophys. Res. Commun.* 121, 172-177 (reference 182).

III. ANTECEDENTES Y MODELOS DE ESTUDIO

Se bien conocida que las nucleótidos de guanina, a través de su interacción con las proteínas G, regulan el estado de afinidad para agonistas de los receptores acoplados ya sea en forma activatoria o inhibitoria a la adonitato ciclase. En 1980, dos grupos de investigadores (170, 171) demostraron que los nucleótidos de guanosina también regulan el estado de afinidad para agonistas de los receptores alfa adrenérgicos (no acoplados al sistema adonitico ciclase). A la luz de los conocimientos disponibles en ese tiempo, no fue posible determinar cual era el sitio de acción de las nucleótidos de guanina en la regulación de este subtipo de receptores.

Por otro parte, recientes datos demostrados (172) que en membranas de adipocitos de Webster tratados con toxina pertussis, el estado de afinidad de los receptores alfa adrenérgicos para agonistas está disminuido, a expensas de una reducción en la proporción de los sitios de unión de alta afinidad, y un aumento de los sitios de baja afinidad, con el efecto correlaciona con un bloqueo de la inhibición de la adonitico ciclase inducida por la activación de los receptores alfa adrenérgicos.

En la contexto general de la existencia los dos subtipos de receptores alfa adrenérgicos, cuyas características desde el punto de vista del número de sitios, la afinidad de unión, nos permiten considerarlos como un modelo de estudio muy atractivo. Se ha observado además (173) que el estado de afinidad de los dos tipos de receptores es modulado por las nucleótidos de guanina. El trabajo de la referencia 173, se realizó con la finalidad de

determinar si esta regulación se ejerce a través de las mismas entidades moleculares, para ello se practicaron en membranas obtenidas de corneas renal de ratas testigo y tratadas con toxina pertussis, experimentos de incorporación de los radioligandos [3H] prostano (antagonista alfa-adrenérgico) y [3H] yohimbina (antagonista beta-adrenérgico), midiendo el número de receptores y el efecto de los radioligandos de guanina sobre el estado de afinidad para agonistas y antagonistas de los dos subtipos de receptores.

REFERENCIA 142

En los trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostramos que en la rata, la administración de la vacuna pertussis (1112) o la toxina purificada (1113) produce un bloqueo persistente de la respuesta preanra inducida por la estimulación de los receptores alfa-adrenérgicos vasculares, sin modificar la respuesta mediada por los receptores beta-adrenérgicos.

En estos estudios, observamos que además del bloqueo de la respuesta alfa-adrenérgica, la administración tanto de la vacuna como de la toxina purificada produce un aumento persistente de la frecuencia cardíaca de 0.75 ± 0.1 a 0.9 ± 0.1 latidos por minuto en ratas testigo y tratadas con la toxina purificada respectivamente, ($p < 0.001$). Este incremento en el cronotropismo, se manifiesta desde las 24 horas y persiste hasta por 15 días después de una sola administración de la vacuna o de la toxina purificada.

El desarrollo y deambular de la rata para hacer los registros fisiológicos sin la influencia del sistema nervioso

central, observamos que después de este procedimiento, la frecuencia de las ondas lentas con la toxina portuaria, que regularmente presentaban cifras superiores a los 300 latidos por minuto, regresaba a los valores observados antes del tratamiento con la toxina. Los valores encontrados en estas condiciones fueron de 306 ± 11 latidos por minuto en las ratas testigo y 247 ± 7 latidos por minuto en las ratas con la toxina portuaria.

Se sabe que la frecuencia cardíaca es regulada en forma recíproca por el tono simpático y el tono parasimpático. El tono simpático a través de la norepinefrina, actuando sobre los receptores beta adrenérgicos, ejerce un efecto cronotrópico positivo, mientras que el sistema parasimpático, a través de la acetilcolina sobre receptores colinérgicos muscarínicos del corazón, ejerce un efecto cronotrópico negativo. En el animal desmedulado y decerebrado la influencia de cada uno de los sistemas es anulada. Con estos antecedentes y el hecho de que el efecto cronotrópico positivo de la toxina portuaria sobre la frecuencia cardíaca se ve afectado por el bloqueo de la acción inhibitoria de los receptores colinérgicos muscarínicos del corazón. En el trabajo de la referencia (117) se comprobó esta hipótesis aplicando tres técnicas metodológicas diferentes: a) mediante el registro electrocardiográfico de la frecuencia cardíaca antes y después de la administración colinérgica del ojo derecho, b) midiendo en condiciones controladas del corazón de la rata la actividad de la acetilcolinesterasa responsable a la estimulación del receptor colinérgico muscarínico y c) midiendo la regulación del estado de actividad del receptor por los nucleótidos de

que, en el campo de acción de incorporación del radioligando específico [³H]-Difenilhidantoinato ([³H]DHD) en una preparación de membranas cerebrales, para la identificación del número de receptores muscarínicos, así como de su afinidad para agonistas y antagonistas.

PRESENCIA DEL

Los nucleótidos de guanine juegan un papel importante en el proceso de estimulación e inhibición de la enzima adenilato ciclasa (figura 1 y 2), así como en la regulación del estado de afinidad para los agonistas. En la mayoría de los receptores, los nucleótidos de guanine no producen cambios significativos en el estado de afinidad para los antagonistas. Sin embargo, en 1982, el grupo de Leffler y colaboradores (17) proponen que en los receptores colinérgicos muscarínicos del cerebro de la rata, los nucleótidos de guanine modulan en forma recíproca el estado de afinidad del receptor para agonistas y antagonistas. Basados en estas observaciones y en nuestra experiencia previa (18, 19) sobre los efectos de la toxina pertussis en el estado de afinidad del receptor para los agonistas de los receptores Alfa adrenérgicos y colinérgicos muscarínicos, decidimos estudiar si esta modulación recíproca se observa en el cerebro de la rata, y de existir, determinar si esta modulación se realiza a través de la misma proteína reguladora.

Para esto fin, se membranas de corteza de ratas testigo y tratadas con la toxina pertussis, se estudió el efecto de los nucleótidos de guanine sobre el estado de afinidad del receptor

para agonistas y antagonistas, empleando el radioligando [3H]-GMB. La afinidad del receptor por los agonistas, se midió a través de los experimentos de desplazamiento del [3H]-GMB por el agonista carbazol.

REFERENCIA 142

Durante el desarrollo del trabajo de la referencia 142, al estudiar el efecto de los nucleótidos de guanina sobre la afinidad de unión de los antagonistas, observamos que en presencia del nucleótido, la interacción del antagonista con el receptor se comportaba experimentalmente consistente con un cambio en la afinidad de unión del receptor por el antagonista, lo cual era de acuerdo de acuerdo al modelo planteado en esas experiencias. El estudio de Gatchand de las curvas de saturación del radioligando, en presencia de nucleótidos de guanina, siempre mostró concavidad hacia abajo. La revisión de la literatura se relaciona a los efectos de los nucleótidos de guanina sobre la unión de antagonistas a los receptores musculares, donde se ve la mayor parte de ellos no se comportaban como en la forma del Gatchand, sin embargo, en algunos casos (176, 177) en los que se presentaba en la gráfica de Gatchand una línea recta, la inspección detallada de los datos experimentales mostraba cierta concavidad hacia abajo.

Estos datos nos sugieren la presencia de cooperatividad positiva en la unión de los antagonistas a los receptores colinérgicos de los músculos del corazón. En el trabajo de la referencia 140, se muestran los datos iniciales de la caracterización de este efecto de los nucleótidos de guanina

sobre los receptores colinérgicos muscarínicos del sistema de la
corteza. Para documentar la presencia de cooperatividad positiva, en
el análisis de los datos de unión del radioligando a las
membranas del receptor, se empleó el método gráfico propuesto en
1975 por De Nigny y Roth (17).

III. EXPERIMENTAL

Los materiales y la metodología empleada se encuentran descritos en la parte experimental de cada uno de los trabajos.

La purificación de la toxina pertussis se realizó a partir de los concentrados de cultivo de Bordetella pertussis, proporcionados por el Instituto Nacional de Higiene (Secretaría de Salud), de acuerdo con los procedimientos descritos por A. L. y Gata (1977) y Maslow (1974), que consisten en precipitación del medio de cultivo con sulfato de amonio, seguida por ultracentrifugación con sulfato de amonio, con el fin de eliminar e interferencia iones, a base, por el método de Takera y colaboradores (1977) que consiste en el paso sucesivo del sobrenadante del medio de cultivo por dos matrices de afinidad (1977) por el tipo y sulfato de amonio (1977). Por ambos procedimientos la toxina se purificada aproximadamente 1000 veces con rendimiento y potencia similares. La actividad de la toxina durante el proceso de purificación se analizó mediante la respuesta del tejido adiposo del transtero a la activación adrenérgica (1977).

La acción de la toxina pertussis en las ratas empleadas en este trabajo, fue confirmada antes de cada experimento por sus efectos sobre la frecuencia cardíaca (1977).

II. RESULTADOS

Los resultados se presentan a continuación en la parte correspondiente a cada uno de los trabajos.

Differential Effect of Pertussis Toxin on the Affinity State for Agonists of Renal α_1 - and α_2 -Adrenoceptors*

(Received for publication, January 31, 1984)

José Luis Boyer†§, Angélica García‡, Carlos Posadas‡, and J. Adolfo García-Sáinz‡§

From the ‡Departamento de Endocrinología, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" and the §Departamento de Bioquímica, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-606, 04510, México, D. F., México

The effect of pertussis toxin treatment on the guanine nucleotide-induced modulation of the affinity of renal α_1 - and α_2 -adrenergic receptors was investigated. Pretreatment of rats with pertussis toxin did not induce any change in the number of or affinity for antagonists of α_1 - or α_2 -receptors studied using [3 H]prazosin and [3 H]yohimbine, respectively. Guanyl-5'-yl imidodiphosphate induced an "up-shift" in the number of α_2 -adrenergic receptors; this up-shift was not observed for α_1 -adrenergic receptors. Pertussis toxin treatment decreased the affinity of epinephrine for the [3 H]yohimbine-binding sites and reduced the ability of guanine nucleotides to modulate α_2 -adrenoceptor agonist affinity. The regulation by guanine nucleotides of α_1 -adrenoceptor affinity for agonists was not altered. These results suggest that the modulation of α_1 - and α_2 -adrenoceptors by guanine nucleotides is probably exerted through different molecular entities.

Guanine nucleotides regulate adenylate cyclase activity and the affinity state for agonists but not for antagonists of receptors linked to the adenylate cyclase (1-5). These actions of guanine nucleotides are mediated through its interaction with proteins that couple the receptors to the cyclase. A large amount of evidence indicates that the guanine nucleotide regulatory proteins involved in receptor-mediated stimulation and inhibition of adenylate cyclase are different (termed N₁ (stimulation) and N₂ (inhibition)) (5-8).

Interestingly, recent evidence indicates that guanine nucleotides modulate the affinity state of receptors not linked to adenylate cyclase such as the α_1 -adrenoceptors (9, 10).

Pertussis toxin, an exotoxin produced by *Bordetella pertussis*, abolishes receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase in several tissues (6, 11-16). The effect of the toxin seems to be due to the ADP-ribosylation of a $M_r = 41,000$ protein, putatively N₂ (17-19). Recently, it has been reported that the action of the toxin decreases the affinity state for

agonists of receptors coupled inhibitorily to the cyclase (20, 21).

Rat kidney cortex membranes contain α_1 - and α_2 -adrenoceptors, and both of these subtypes of α -adrenoceptors seem to be modulated in their affinity state for agonists by guanine nucleotides (10). The effect of pertussis toxin on the regulation of the affinity state for agonists of renal α_1 - and α_2 -adrenoceptors was studied. It was observed that the toxin does not affect the number of or affinity for antagonists of α_2 -adrenoceptors but markedly decreased their affinity state for agonists; no effect of pertussis toxin on α_1 -adrenoceptors was observed. It is suggested that the regulation of the affinity state by guanine nucleotides of α_1 - and α_2 -adrenoceptors occurs through different molecular entities.

MATERIALS AND METHODS

Gpp(NHpp) and (+)-epinephrine were obtained from Sigma; [H]prazosin (25.0 Ci/mmol) was from Amersham Corp. and [3 H]yohimbine (75.4 Ci/mmol) was from New England Nuclear. Phentolamine was a gift from Ciba-Geigy.

Pertussis Toxin Preparation—Pertussis toxin was purified from whole pertussis vaccine as previously described (12, 22, 23). By this procedure, the toxin was purified approximately 1800-fold.

Treatment of Rats with Pertussis Toxin—Male Wistar rats were injected intraperitoneally with pertussis toxin at a dose of 50 μ g/100 g of rat weight. Control rats were injected with the vehicle used to dissolve pertussis toxin. The rats were killed 5 days after treatment.

Preparation of Renal Cortical Membranes—Renal cortical membranes were prepared by a modification of the method of Fitzpatrick *et al.* (24). In short, kidneys were quickly removed and washed with saline (0.85% NaCl) and the outer cortex was dissected, minced, and homogenized gently in 10 volumes of homogenization buffer (containing 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.25 M sucrose, pH 7.5) with a motor-driven glass Potter-Elvehjem homogenizer (two strokes) followed by a second homogenization with a tight Teflon-glass Potter-Elvehjem homogenizer (three strokes). The crude homogenate was filtered through four layers of cheesecloth and centrifuged 10 min at 1,500 \times g; the precipitate was resuspended in 2 M sucrose, and mixing was achieved with three strokes of the homogenizer. The mixture was centrifuged 10 min at 13,000 \times g. The supernatant was diluted with water (1:8), filtered, and centrifuged 10 min at 10,000 \times g. The supernatant and the upper pellet were again carefully separated and centrifuged 15 min at 35,000 \times g. The final pellet was resuspended to a protein concentration of 5 mg/ml with incubation buffer containing 50 mM Tris, pH 7.5, 10 mM MgCl₂.

Radioligand Binding Assays—Binding was performed as described by Snavely and Insel (10) using [3 H]prazosin and [3 H]yohimbine. Displacement curves indicated that the binding sites detected with these ligands displayed clearly the characteristics expected for α_1 - or α_2 -adrenergic receptors, *i.e.* at the [PH]prazosin sites, prazosin is ≈ 3000 fold more potent than yohimbine (IC_{50} 0.3 and 1000 nM for prazosin and yohimbine, respectively), whereas at the [3 H]yohimbine sites, yohimbine is ≈ 20 -fold more potent than prazosin (IC_{50} 23 and 690 nM for yohimbine and prazosin, respectively). For competition experiments where the affinities of the nonradioactive agonist epinephrine were measured, [3 H]prazosin and [3 H]yohimbine concentrations were 0.2 and 20 nM, respectively. Hill coefficients or slope factors for nonradioactive agonist competing for the radioligand-binding sites were calculated from the slope of a plot of log [% B/(100 - % B)] versus log [nonradioactive agonist] where B is the percentage of radioligand binding displaced by the competing agent.

Protein was measured by the method of Lowry *et al.* (25) using bovine serum albumin as standard.

* The abbreviation used is: Gpp(NHpp), guanyl-5'-yl imidodiphosphate.

* This research was supported by a grant from the Fondo de Estudios e Investigaciones "Ricardo L. Zevada." The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

RESULTS AND DISCUSSION

The binding of [3 H]prazosin and [3 H]yohimbine to renal cortical membrane was saturable, and Scatchard analysis of the data for both ligands gave straight lines indicating a single class of noncooperative binding sites (Fig. 1). In membranes obtained from rats that had been treated with pertussis toxin, the number of binding sites (B_{max}) and the dissociation constant (K_D) for renal cortical α_1 - and α_2 -adrenergic receptors were nearly identical to those observed in the control rats, i.e., [3 H]prazosin sites: for control, $B_{max} = 128 \pm 8$ fmol/mg of protein and $K_D = 0.21 \pm 0.01$ nM, and for pertussis toxin, $B_{max} = 120 \pm 10$ fmol/mg of protein and $K_D = 0.23 \pm 0.01$ nM; [3 H]yohimbine sites: for control, $B_{max} = 307 \pm 25$ fmol/mg of protein and $K_D = 22.5 \pm 2$ nM, and for pertussis toxin, $B_{max} = 353 \pm 12$ fmol/mg of protein and $K_D = 21.6 \pm 1$ nM (see also Fig. 1). These results indicate that pertussis toxin does not change either the number of sites or the affinity for antagonists of the adenylate cyclase-coupled (α_2) and noncoupled (α_1) adrenergic receptors.

Incubation of renal cortical membranes in the presence of 0.1 mM Gpp(NH)p produced a significant increase in the number of [3 H]yohimbine binding sites (Fig. 2). Neither the number of [3 H]prazosin binding sites nor the affinity of the binding sites for the radioligands was modified by the presence

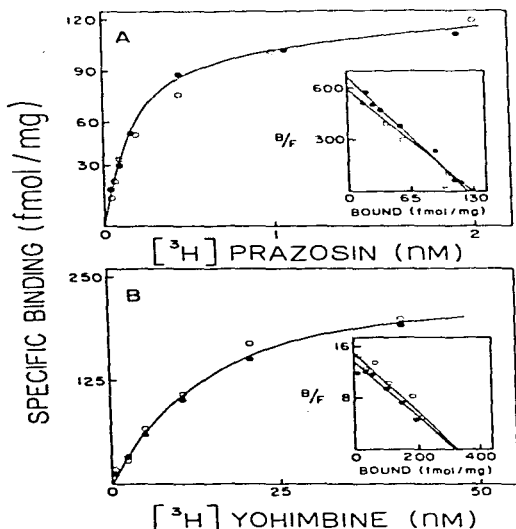


FIG. 1. Effect of pertussis toxin on [3 H]prazosin and [3 H]yohimbine binding to renal cortical membranes. Binding experiments were performed as described under "Materials and Methods" using [3 H]prazosin (A) and [3 H]yohimbine (B). Membranes were prepared from control (●) and pertussis toxin-treated (○) rats. The insets show Scatchard analysis of the binding isotherms. The data shown are representative results of those obtained in at least four experiments.

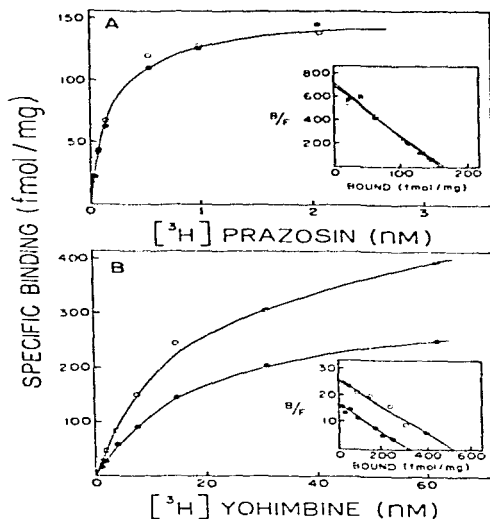


FIG. 2. Effect of Gpp(NH)p on [3 H]prazosin and [3 H]yohimbine binding to renal cortical membranes. Binding experiments were performed as described under "Materials and Methods" using [3 H]prazosin (A) and [3 H]yohimbine (B) in membranes prepared from control rats in the absence (●) or presence (○) of 0.1 mM Gpp(NH)p. The insets show Scatchard analysis of the binding isotherms. The results shown are representative experiments replicated at least four times.

of Gpp(NH)p (Fig. 2, insets). The guanine nucleotide-induced "up-shift" in the number of renal α_2 -adrenergic receptors was also observed although to a lesser extent in pertussis toxin-treated rats, i.e., a $95 \pm 13\%$ increase in B_{max} by Gpp(NH)p was observed in control membranes, whereas only a $50 \pm 5\%$ increase was observed in membranes from toxin-treated rats ($p < 0.001$). The mechanism(s) involved in this guanine nucleotide-promoted up-shift in the number of renal α_2 -adrenergic receptors is not clear. Burgisser *et al.* (26) have observed that guanine nucleotides regulate the affinity state for antagonists of the muscarinic receptors of frog heart. Our results are different. Guanine nucleotides seem to alter the number of sites rather than their affinity for the antagonist. The most likely explanation for our results seems to be a nucleotide-promoted release of tightly bound endogenous agonist from a high affinity state which then frees up more receptors for ligand binding. However, even taking into account this up-shift, the total number of α_2 -adrenergic receptors is not very different in control membranes as compared to membranes from toxin-treated animals (≈ 598 fmol/mg of protein in control membranes as compared to ≈ 530 fmol/mg in the pertussis toxin group).

The lack of effect of guanine nucleotide-induced modulation in the number of α_1 -adrenergic receptors seems to indicate

TABLE I
Effect of pertussis toxin on the Hill coefficient of displacement by epinephrine and agonist affinity of the α_1 - and α_2 -adrenergic receptors

Agonist competition experiments were performed as described under "Materials and Methods." Values are the means \pm S.E. of four separate experiments.

Treatment	Agents	$[^3\text{H}]$ Prazosin		$[^3\text{H}]$ Yohimbine	
		EC_{50} μM	Hill coefficient	EC_{50} μM	Hill coefficient
Control	Epinephrine	0.46 ± 0.12	0.56 ± 0.03	0.26 ± 0.05	0.53 ± 0.02
	Epinephrine + Gpp(NH)p	2.65 ± 0.30 (5.8) ^a	0.91 ± 0.05	3.63 ± 0.86 (14.9) ^b	0.98 ± 0.01
Pertussis toxin	Epinephrine	0.42 ± 0.08	0.64 ± 0.03	1.04 ± 0.08^c	0.83 ± 0.07
	Epinephrine + Gpp(NH)p	2.56 ± 0.32 (6.1)	0.92 ± 0.1	3.02 ± 0.11 (2.87)	0.94 ± 0.08

^aIn parentheses is presented the fold displacement in EC_{50} for epinephrine by Gpp(NH)p.

^b $p < 0.001$ compared to control.

^c $p < 0.01$ compared to control.

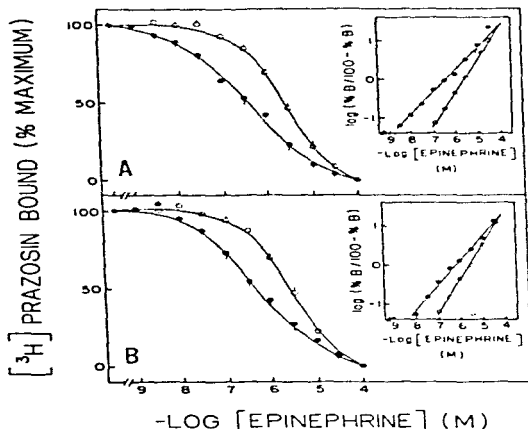


FIG. 3. Effect of pertussis toxin treatment on the displacement by epinephrine of specific $[^3\text{H}]$ prazosin binding in the presence and absence of Gpp(NH)p. Renal cortical membranes were prepared as described under "Materials and Methods" from control (A) and pertussis toxin-treated (B) rats. Membranes were incubated with 0.2 nM $[^3\text{H}]$ prazosin and varying concentrations of (-)epinephrine in the absence (\bullet) or presence (\circ) of 0.1 mM Gpp(NH)p. The data shown are the means \pm S.E. of duplicate determinations of four separate experiments. The insets show the Hill analysis of the competition studies.

that the regulation by guanine nucleotide is of a different nature.

In order to determine whether pertussis toxin treatment induced changes in the affinity of the renal α_1 - and α_2 -adrenergic receptors for agonists or in its modulation by guanine nucleotides, displacement of $[^3\text{H}]$ prazosin and $[^3\text{H}]$ yohimbine binding by epinephrine was measured in the absence or presence of 0.1 mM Gpp(NH)p.

In membranes from control animals, the displacement of $[^3\text{H}]$ prazosin binding by epinephrine in the absence of Gpp(NH)p gave a shallow curve with a Hill coefficient of 0.56

± 0.03 (Fig. 3 and Table I), suggesting the presence of heterogeneous binding sites. Addition of 0.1 mM Gpp(NH)p causes a 6-fold shift to the right in the displacement curve of epinephrine, as well as an increase in the Hill coefficient to 0.91 ± 0.05 (Table I). These results indicate that guanine nucleotides decrease the ability of epinephrine to inhibit $[^3\text{H}]$ prazosin binding, suggesting a shift in the receptors to a homogeneous low affinity binding state for agonists (Fig. 3A).

Pertussis toxin treatment did not alter the affinity state of the α_1 -adrenergic receptors for agonists nor its modulation by guanine nucleotides (Fig. 3B and Table I).

In renal cortical membranes from control rats, the displacement of $[^3\text{H}]$ yohimbine binding by epinephrine in the absence of Gpp(NH)p produced a displacement curve consistent with a heterogeneous population of sites as suggested by a Hill coefficient of 0.53 ± 0.02 . Guanine nucleotides induced a shift to the right in the displacement curve of ≈ 15 -fold, increasing also the steepness of the curve with a Hill coefficient near 1 (Fig. 4A, inset, and Table I). In renal cortical membranes from pertussis toxin-treated rats, the displacement of $[^3\text{H}]$ yohimbine binding by epinephrine in the absence of Gpp(NH)p showed a significant increase in the EC_{50} for epinephrine as compared to the controls (Fig. 4 and Table I).

An increase in the Hill coefficient from 0.53 ± 0.02 in controls to 0.83 ± 0.07 in treated animals was observed (Fig. 4, insets), suggesting that pertussis toxin induces a decrease in the affinity of the binding sites for agonists, probably by altering the ratio between receptors in high and low affinity, as evidenced by the slope factors, i.e. favoring the low affinity state for agonist conformation.

The presence of guanine nucleotides produced only a further 3-fold reduction in the affinity for epinephrine in the pertussis toxin-treated rats and a small change in the slope factor (Table I).

Pertussis toxin blocks the transfer of inhibitory information from receptors to adenylate cyclase (11, 16), as well as the GTPase activity associated with inhibition of adenylate cyclase (27, 28). The diminished affinity for agonists and the decreased sensitivity to guanine nucleotides of α_2 -adrenoceptors observed in the present study are consistent with the findings of other authors (20, 21). It is possible that the blockade by pertussis toxin of the GTPase activity may produce a great number of N₁ proteins to have GTP bound. However, if so, N₁ should be in the "active" form, producing a constant inhibition of cyclase, which does not happen (6, 7, 11-20, 27-30). Guanosine triphosphate inhibits adenylate cyclase (7, 8), and this inhibition is blocked by pertussis toxin (14, 27, 29, 30). The data suggest that the toxin, in addition

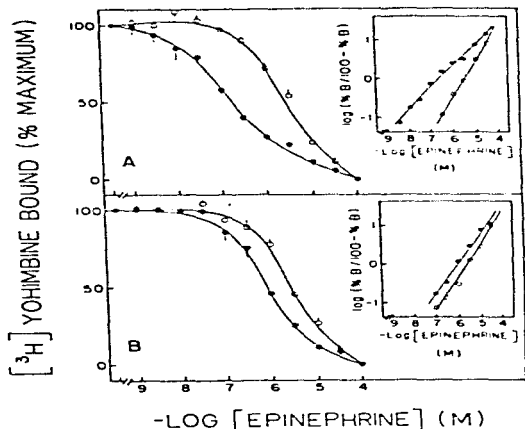


FIG. 4. Effect of pertussis toxin treatment on the displacement by epinephrine of specific [^3H]yohimbine binding in the presence and absence of Gpp(NH)p. Renal cortical membranes were prepared as described under "Materials and Methods" from control (A) and pertussis toxin-treated (B) rats. Membranes were incubated with 20 nM [^3H]yohimbine and varying concentrations of (-)-epinephrine in the absence (\bullet) or presence (\circ) of 0.1 mM Gpp(NH)p. Data shown are the means \pm S.E. of duplicate determinations of four separate experiments. The insets show the Hill analysis for competition studies.

to inhibiting the GTPase activity of N_1 , is probably deteriorating the functional interaction of N_1 with adenylate cyclase.

Hydrolysis-resistant GTP analogues also inhibit adenylate cyclase activity (7, 27, 29-31). Interestingly, the inhibitory effect of these analogues is not completely abolished by pertussis toxin as is the effect of GTP (7, 27, 29, 30). The most likely explanation of the differences between the effects of GTP and those of Gpp(NH)p as affected by pertussis toxin is the possible action of Gpp(NH)p on sites besides N_1 to inhibit adenylate cyclase.

Guanine nucleotides putatively acting on a guanine nucleotide regulatory protein modulate the affinity for agonists of renal α_1 -adrenoceptors. The absence of effect of pertussis toxin on these receptors, together with the inability of guanine nucleotides to induce an up-shift, suggests that the regulation of the state of affinity for agonists of α_1 - and α_2 -adrenoceptors is through different mechanisms probably involving different guanine nucleotide regulatory proteins.

The functional significance of such pertussis toxin-insensitive guanine nucleotide regulatory protein in the mechanism of signal transduction of α_1 -adrenoceptors remains to be elucidated.

The effect of pertussis toxin on α_2 -adrenoceptors observed in the present study probably has physiological significance.

Recent experiments of our group² have shown that pertussis toxin induces alterations in the adrenergic modulation of renin release. This effect seems to be due to blockade of the inhibitory action of renin release mediated through renal cortical α_2 -adrenoergic receptors.

Acknowledgments—We thank Drs. González-Pacheco and Villalba for the generous donation of pertussis vaccine concentrates, and Guadalupe Ramirez for typing the manuscript.

REFERENCES

- Cooper, D. M. F. (1982) *FEBS Lett.* **138**, 157-163
- Hoffman, B. B., and LeKowitz, R. J. (1980) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**, 681-698
- Tan, B. S., and LeKowitz, R. J. (1979) *Mol. Pharmacol.* **16**, 61-68
- Abramowitz, J., Isenberg, R., and Birnbaumer, L. (1979) *Mol. Cell. Endocr.* **16**, 129-146
- Redbell, M. (1980) *Nature (Lond.)*, **284**, 17-22
- Katada, T., and Ui, M. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7210-7216
- Hildebrandt, J. D., Sekura, R. D., Codina, J., Isenberg, R., Manclark, C. R., and Birnbaumer, L. (1983) *Nature (Lond.)* **302**, 706-709
- Smith, S. K., and Limbird, L. E. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 10471-10478
- Goedhardt, M., Ferry, N., Geynet, P., and Hanoune, J. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 11877-11883
- Snively, M. D., and Insel, P. A. (1982) *Mol. Pharmacol.* **22**, 532-546
- García Sáinz, J. A. (1981) *FEBS Lett.* **126**, 306-308
- Martínez Olmedo, M. A., and García Sáinz, J. A. (1983) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **115**, 794-799
- Moreno, F. J., Mills, L., García Sáinz, J. A., and Fain, J. N. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 10938-10943
- Murayama, T., and Ui, M. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 3319-3326
- Resina, T. D., Zhang, Y., and Sekura, R. D. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**, 794-799
- Katada, T., and Ui, M. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 8310-8317
- Katada, T., and Ui, M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 3129-3133
- Bockoch, H. M., Katada, T., Northup, J. K., Hewlett, E. L., and Gilman, A. G. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 2072-2075
- Codina, J., Hildebrandt, J. D., Bengar, R., Birnbaumer, L., Sekura, R. D., and Ui, M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 4276-4280
- Kurose, H., Katada, T., Amano, T., and Ui, M. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 4870-4875
- Kurose, H., Shibasaki, O., and Tanaka, C. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**, 325-330
- Yajima, M. K., Hosoda, K., Kanbayashi, Y., Nakamura, T., Nogimori, K., Mizushima, Y., Nakase, Y., and Ui, M. (1978) *J. Biochem. (Tokyo)* **83**, 295-303
- Arai, K., and Saito, Y. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **444**, 765-782
- Fitzpatrick, D. F., Davenport, B. R., Forte, L., and Landon, E. J. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 3561-3569
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- Burgisser, E., Lean, A. D., and LeKowitz, R. J. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 1732-1738
- Aktories, K., Schultz, G., and Jakobs, K. H. (1983) *FEBS Lett.* **158**, 169-173
- Burns, D. L., Hewlett, E. L., Moss, J., and Vaughan, M. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 1435-1438
- Fain, J. N., O'Donnell, G. J., Mills, L., and García Sáinz, J. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116**, 651-656
- Aktories, K., Schultz, G., and Jakobs, K. H. (1983) *FEBS Lett.* **156**, 88-91
- Hildebrandt, J. D., Hanoune, J., and Birnbaumer, L. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 14723-14725

J. J. Pedraza, C. Alatorre, M. E. Barra, J. C. Peña, and J. A. García Sáinz, manuscript submitted for publication.

EFFECT OF PERTUSSIS TOXIN ON THE HEART MUSCARINIC-CHOLINERGIC
RECEPTORS AND THEIR FUNCTION.

José Luis Boyer^{a,b}, Miguel Martínez-Cárcamo^b, Antonio Monroy-Sánchez^b,
Gustavo Pastelín^c, Carlos Posadas^b and J. Adolfo García-Sáinz^{a,d}.

^aDepartamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-600, 04510 México, D.F.; ^bDepartamento de Endocrinología and ^cDepartamento de Farmacología, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Juan Badiano # 1, 14080 México D.F.

Summary

Administration of pertussis toxin to rats induced a significant increase in heart rate that was evident as soon as 24 hours after the administration of the toxin and that persisted for at least 15 days. Electrical stimulation of the vagus decreased dramatically the heart rate of control animals but was unable to do it so in rats treated with pertussis toxin. In cardiac membranes muscarinic agonists decreased adenylate cyclase activity ($\approx 20-25\%$); no effect was observed in membranes obtained from toxin-treated animals. Agonist displacement of antagonist binding ($[^3\text{H}]$ Quinuclidinyl benzilate) indicated that treatment with pertussis toxin decreased the proportion of receptors in the high affinity state for agonists. All this data suggest that blockade of the parasympathetic tone plays a key role in the induction of tachycardia by pertussis toxin.

Heart rate is dynamically regulated by the autonomic nervous system. The sympathetic branch of the nervous system exerts positive chronotropic effects through the neurotransmitter norepinephrine that activates the beta-adrenoceptors present in the myocyte plasma membrane. The parasympathetic branch exerts negative chronotropism through the release of acetylcholine which interacts with cardiac muscarinic-cholinergic receptors (1,2). These receptors are coupled in an opposite fashion to adenylate cyclase, i.e. beta-adrenoceptors activate adenylate cyclase whereas cholinergic-muscarinic receptors inhibit this enzyme (1,2). The interaction between these receptors and the cyclase is mediated through the guanine nucleotide-binding regulatory proteins (termed N_s for activation and N_i for inhibition) (3,4).

Pertussis toxin (PT) blocks the actions of hormones and neurotransmitters that inhibit adenylate cyclase by catalyzing the ADP-ribosylation of N_i (5-8). We have observed that administration of pertussis vaccine (9) or purified pertussis toxin to rats (10) induces a persistent tachycardia. Such tachycardia can be explained on the basis of the effects of the toxin on N_i blocking the actions of muscarinic cholinergic receptors. It has already been shown that incubation of heart myocytes with pertussis toxin blocks the actions of muscarinic receptors on adenylate cyclase (11). We have performed a systematic

^dTo whom correspondence should be addressed.

study on the actions of pertussis toxin administration on the heart muscarinic receptor functions; the study includes physiological, pharmacological and biochemical approaches and is the matter of this communication.

Materials and Methods

Guanyl-5'-yl imido diphosphate, atropine sulfate, dithiothreitol (DIT), cyclic adenosine monophosphate, adenosine triphosphate, guanosine triphosphate, phosphoenol pyruvate, pyruvate kinase, oxotremorine sesquifumarate, and isobutyl methyl xanthine (IBMX) were obtained from Sigma. [³H]Quinuclidinyl benzilate ([³H]QNB), (30.2 Ci/nmol) was obtained from New England Nuclear.

Pertussis toxin was purified from pertussis vaccine concentrates obtained from the National Institute of Hygiene of Mexico (Secretaría de Salud) as described previously (12, 13) or by the method of Sekura et al (14); both procedures result in preparations with identical activities. Male Wistar rats (200-250 g) were injected i.p. with either PT (50 µg/100 g of body weight) or the vehicle used to dissolve PT. Rats were used for the experimental protocols 2-3 days after treatment.

Negative Chronotropic Effect Induced by Electrical Stimulation of the Vagus: Rats were anesthetized with ether, a tracheal cannula was inserted and α-D-glucoclohalalose was administered (80 mg/kg i.v.). The right cervical vagosympathetic trunk was transected. Electrical stimuli were applied to the cardiac end of the nerve through bipolar platinum electrodes at 0.5 m sec. duration and intensity of 10 V, the stimuli obtained from a Grass S-8 stimulator, were delivered at frequencies from 10 to 50 Hz, in trains lasting 2 sec. Where indicated prostigmine at dose of 0.1 mg/kg i.v. was administered before electrical stimulation.

Preparation of Heart Membranes: Rats were sacrificed, hearts quickly removed and washed with ice cold saline solution (0.85% NaCl), membranes for adenylate cyclase activity and binding experiments were prepared by a procedure similar to that described by Burgisser et al (15). The pellets were resuspended in 50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 7.5 for binding experiments or in 50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 1 mM IBMX, 100 mM NaCl, pH 7.4 for adenylate cyclase assays

Adenylate Cyclase Activity: After membranes were resuspended, 5 mM DIT (final concentration) was added. Incubations were in a final volume of 110 µl in the presence of 50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 1 mM IBMX, 100 mM NaCl, 1.5 mM ATP, 10 µM GTP, 7.5 mM phosphoenolpyruvate, and 130 µg/ml pyruvate kinase, pH 7.4 for 10 min. at 37°C. Cyclic AMP was quantified by the method of Gilman (16).

Binding Experiments: Plasma membranes (250 µg/tube) were incubated with 0.2 nM [³H]QNB 50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 7.4 in a final volume of 1 ml at 25°C for 60 min in the presence of different concentrations of unlabeled oxotremorine, where indicated, 100 µM Gpp(NH)p was present. Non specific binding was determined with 1 µM atropine.

Incubation was terminated by rapid filtration over Whatman GF/C filters, and washed with 20 ml ice-cold buffer. Binding experiments were analyzed by a computer version of the Ligand program developed by Munson and Rodbard, that performs iterative non-linear regression analysis of the data (17). Protein was measured by the method of Lowry et al (18) using bovine serum albumin as standard.

Results

In agreement with our previous reports (9,10) administration of pertussis toxin induced a significant tachycardia (from 379 ± 7 beats per min in the controls to 524 ± 6 in the pertussis toxin-treated group; mean \pm SEM of 15 determinations using different animals; $p < 0.001$). This was observed as early as 24 hs after treatment and persisted for at least 15 days (not shown).

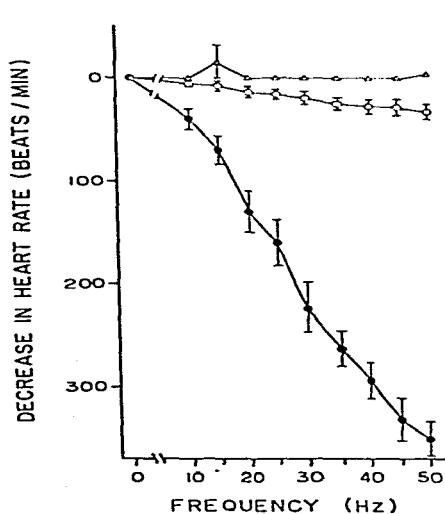


FIG. 1

Effect of Electrical Stimulation of the vagus on Heart Rate. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of five animals in each case. Controls (●), rats pretreated with atropine (0.5 mg 1 Kg) (Δ) and pertussis toxin-treated rats (○).

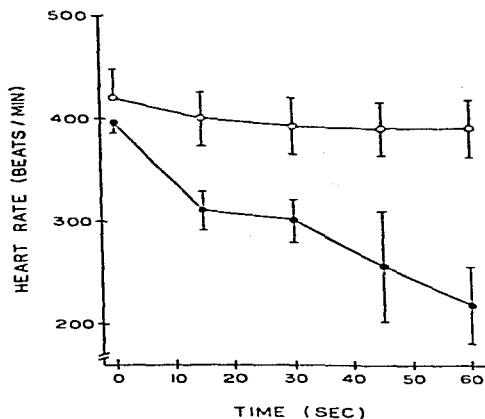


FIG. 2

Time-Course of the Effect of Prostigmine Administration on Heart Rate. Controls (●), pertussis toxin-treated rats (○).

Administration of chloralose decreased the heart rate of the pertussis toxin-treated rats to values similar to those observed in control animals (375-425 beats/min). Electrical stimulation of the vagus in control animals produced a dramatic decrease in heart rate (Fig. 1). The decrease in heart rate was rapid and clearly dependent on the frequency of electrical stimulation employed (Fig. 1). Administration of atropine (0.5 mg/kg) blocked the effect of electrical stimulation (Fig. 1). Administration of prostigmine (0.1 mg/kg) decreased heart rate in control animals (Fig. 2) and magnified the effect of electrical stimulation, i.e. the frequency of stimulation-response curve was

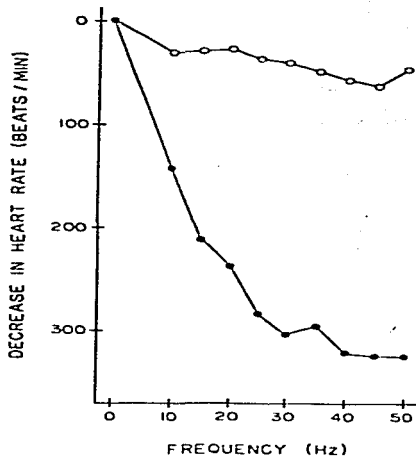


FIG. 3

Magnification by Prostigmine of the Effect of Electrical Stimulation of the Vagus on Heart Rate. Control (O); pertussis toxin-treated rats (●). Plotted is the average of 3 experiments in each case.

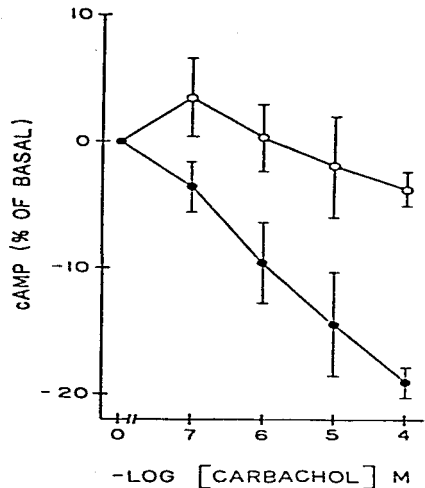


FIG. 4

Effect of Carbachol on Adenylate Cyclase Activity. Results are presented as % of basal activity which was 27 ± 2 and 28 ± 2 pmol/min per mg protein for membranes from control and pertussis toxin-treated rats, respectively. Plotted are the means and vertical lines represent the SEM of 6 experiments using different membrane preparations. Control membranes (●) membranes from pertussis toxin-treated rats (O).

clearly shifted to the left (Fig. 3). Under all this conditions (Figs. 1 - 3) no effect on heart rate was observed in pertussis toxin-treated animals indicating that the action of muscarinic receptors was blocked.

In order to further substantiate the findings the effect of cholinergic agents on adenylate cyclase activity was studied. Carbachol consistently induced an inhibition of basal adenylate cyclase activity of $\approx 20-25\%$ in cardiac membrane preparations obtained from control animals (Fig. 4). In contrast, no significant inhibition was observed in membranes from toxin-treated rats (Fig. 4). The beta-adrenergic agonist, isoproterenol, stimulated 60-70% adenylate cyclase activity in control membranes ($EC_{50} \approx 2 \times 10^{-6}$ M) (Fig. 5). The stimulation produced by isoproterenol in cardiac membranes from toxin-treated rats was bigger than that

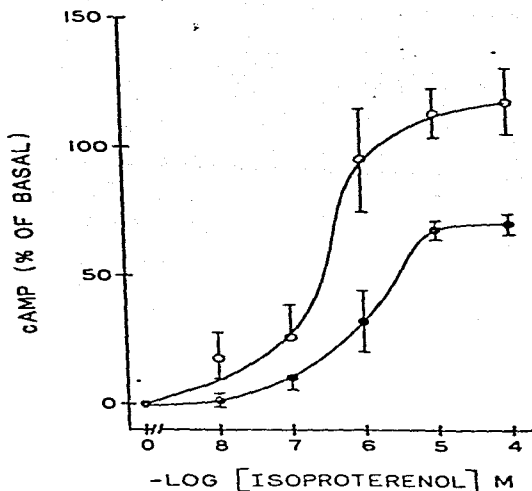


FIG. 5

Effect of Isoproterenol on Adenylate Cyclase Activity. Control membranes (●), membranes obtained from pertussis toxin-treated rats (O). Other indications as in Fig. 4

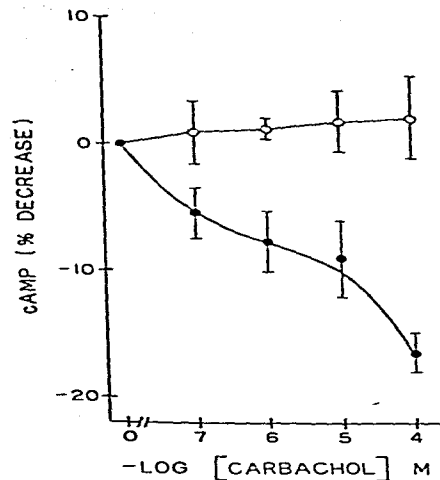


FIG. 6

Effect of Carbachol on Isoproterenol-stimulated Adenylate Cyclase. Membranes from control (●) or pertussis toxin-treated rats (O) were incubated in the presence of 10^{-5} M isoproterenol and different concentrations of carbachol. Results are expressed as % decrease in activity. Absolute 100% values were 45 ± 2 and 55 ± 4 pmol/min per mg protein for membranes obtained from control and pertussis toxin-treated rats. Other indications as in Fig. 4.

in the controls (i.e. 120-130% increase) and the concentration-response curve was shifted to the left as compared to the control curve ($EC_{50} \sim 3 \times 10^{-7}$ M). Carbachol clearly diminished isoproterenol-stimulated adenylate cyclase activity in control membranes (Fig. 6) but no effect was produced by the cholinergic agonist in membranes from toxin-treated rats (Fig. 6).

[3 H]QNB binding to cardiac membranes was rapid and reversible as shown by other authors. No significant change in number of sites in membranes from control or pertussis toxin-treated rats was observed (B_{max} 194 ± 8 and 211 ± 16 fmol/mg protein in membranes from control and pertussis toxin-treated rats respectively; mean \pm SEM of five determinations in each case). Binding competition experiments with the cholinergic agonist oxotremorine indicated that

TABLE I.

Parameters derived from the competition curves of oxotremorine with [^3H]QNB in heart membranes from Control and Pertussis Toxin-Treated Rats.

	Control	Control + Gpp(NH)p	Pertussis-Treated	Pertussis-Treated + Gpp(NH)p
K_H (nM)	8.9 ± 2.7	-	12.6 ± 4.4	-
K_L (nM)	967 ± 205	840 ± 165	632 ± 52	885 ± 73
R_H (%)	60.5 ± 2.2	-	37.5 ± 1.0^a	-
R_L (%)	39.5 ± 2.2	100	62.5 ± 1.0^a	100

^ap < 0.001 compared to control group.

in control membranes two affinity states for agonists were clearly evidenced (Table I). The hydrolysis-resistant analogue of GTP, Gpp(NH)p, shifted the affinity state for agonists towards the low affinity state (Table I). In membranes from toxin-treated rats two states of affinity were also detected but the proportion of sites in low affinity state was significantly increased; Gpp(NH)p shifted the remaining receptor in high affinity state towards the low affinity conformation (Table I).

Discussion

The action of *in vivo* administration of pertussis toxin was studied at different levels: whole animal (tachycardia), heart preparation (electrical stimulation of the vagus) and cardiac membranes (adenylate cyclase activity and binding studies). All the information obtained is consistent with blockade of the muscarinic cholinergic effects in the heart by the action of the toxin. On the basis of the data of this study and what is already known about the actions of the toxin (5, 6) the following sequence of events can be proposed for the induction of tachycardia: A) the toxin interacts with the cardiomyocytes and after a lag of several hours (required for internalization and processing of the toxin) ADP-ribosylates N_i ; B) ADP-ribosylation of N_i blocks the formation of the high affinity state for agonist of receptors coupled through it (i.e. receptors coupled in an inhibitory fashion) to adenylate cyclase; C) blockade of the action of the mediators that act through these receptors.

Heart rate is controlled by two opposing systems: the sympathetic system and the parasympathetic system. Our results clearly show that pertussis toxin-induced tachycardia is due to an imbalance between these two systems, i.e. the toxin blocks the action of the parasympathetic action. Furthermore an increase in the sympathetic action was also observed in this study. Increased action of agents that stimulate adenylate cyclase has been observed in a variety of models (see references 5 and 6) and possibly results from an altered interplay between the subunits of the guanine nucleotide regulatory proteins (N_i and N_s) (19).

It is worth mentioning that a small percentage of the receptors remained in the high affinity state for agonists in spite of the treatment with the toxin but activation of these receptors did not result in any significant decrease in heart rate *in vivo* or adenylate cyclase activity *in vitro*. These

data can be explained by the presence of a small population of muscarinic receptors not coupled to N_1 but to another guanine-nucleotide regulatory protein (pertussis toxin-insensitive). We have presented evidence of such protein for the regulation of affinity of the renal α_1 -adrenoceptor (20) and Evans et al (21) for muscarinic receptors of cultured cells. In cultured chick heart cells pertussis toxin blocks the ability of muscarinic agents to inhibit adenylate cyclase but not their action on phosphoinositide turnover (22). Other authors (23) have observed that treatment of cardiac membranes with pertussis toxin shifts the muscarinic receptors to the low affinity state for agonist; unfortunately these authors did not present a detailed analysis of their binding data. In a recent paper it was reported that in chicks treated *in vivo* with pertussis toxin the heart muscarinic receptors are in the low affinity state for agonists but that the treatment with the toxin was unable to block the inhibition of adenylate cyclase induced by muscarinic agents (24). The reason for the difference between our finding and the study with chick heart (24) is at the present unclear.

Finally, it is important to emphasize that our findings have clinical importance. Pertussis toxin vaccines currently available contain active pertussis toxin (25). It has been reported the case of a patient that developed paroxysmal supraventricular tachycardia after pertussis vaccine administration (26); interestingly, the alteration in heart rate was controlled with the administration of propranolol (26). Obviously pertussis vaccines devoid of such side effects are required (25).

Acknowledgements

This research was partially supported by a Grant from CONACYT (PCSABNA 22620). J. A. García-Sáinz is a 1985-1986 Guggenheim Fellow. The authors thank Ms. Guadalupe Ramírez for typing the manuscript.

References

1. E. BROWNWALD, E.H. SONNENBLICK and J. ROSS, Heart Disease, A Text Book of Cardiovascular Medicine, (E. Brownwald (Ed.)) pp 413-452, W.B. Saunders Co. Philadelphia (1980).
2. S. E. MAYER, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (A.G. Gilman, L.S. Goodman and A. Gilman) pp 56-90, MacMillan Publishing Co., New York (1980).
3. A. G. GILMAN, J. Clin. Invest. 73 1-4 (1984).
4. J. CODINA, J. HILDEBRANDT, R. IYENGAR, L. BIRNBAUMER, R.D. SEKURA and C.R. MANCLARK, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80 4276-4280 (1983).
5. M. UI, Trends Pharmacol. Sci. 5 277-279 (1984).
6. J. A. GARCIA-SAINZ, Pertussis Toxins (R. Sekura, J. Moss and M. Vaughan, Eds.) Academic Press, in press.
7. T. KATADA and M. UI, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79 3129-3133 (1982).
8. C. C. MALBON, P.J. RUPIEJKO and J.A. GARCIA-SAINZ, FEBS Lett. 176 301-306 (1984).
9. J. L. BOYER, C. POSADAS and J. A. GARCIA-SAINZ, Eur. J. Pharmacol. 83 123-125 (1982).
10. J. L. BOYER, C. CARDENAS, C. POSADAS and J. A. GARCIA-SAINZ, Life Sci. 33 2627-2633 (1983).
11. O. HAZEKI and M. UI, J. Biol. Chem. 256 2856-2862 (1981).
12. M. A. MARTINEZ-OLMEDO and J. A. GARCIA-SAINZ, Biochim. Biophys. Acta 760 215-220 (1983).
13. H. ARAI and Y. SATO, Biochim. Biophys. Acta 444 765-782 (1976).
14. R. D. SEKURA, F. FISH, C. R. MANCLARK, B. MEADE and Y. ZHANG, J. Biol. Chem. 258 14647-14651 (1983).

15. E. BURGISSER, A. DE LEAN and R.J. LEFKOWITZ, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79 1732-1736 (1982).
16. A. G. GILMAN, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67 305-312 (1970).
17. P. J. MUNSON and D. ROEBARD, Anal. Biochem. 107 220-239 (1980).
18. O. H. LONRY, N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL, J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).
19. T. KATADA, G.M. BOKOCH, M.D. SMIGEL, M. UI and A.G. GILMAN, J. Biol. Chem. 259 3526-3595 (1984).
20. J. L. BOYER, A. GARCIA, C. POSADAS and J.A. GARCIA-SAINZ, J. Biol. Chem. 259 8076-8079 (1984).
21. T. EVANS, M.W. MARTIN, A.R. HUGHES and T.K. HARDEN, Mol. Pharmacol. 27 32-37 (1985).
22. S.B. MASTERS, M.W. MARTIN, T. K. HARDEN and J.H. BROWN, Biochem. J. 227 933-937 (1985).
23. H. KUROSE and M. UI, J. Cyclic Nucl. Prot. Phosph. Res. 9 305-318 (1984).
24. K. K. McNAHON, R.D. GREEN and M.M. HOSEY, Biochem. Biophys. Res. Commun. 126 622-629 (1985).
25. A. ROBINSON, L.I. IRONS AND L.A.E. ASHWORTH, Vaccine 3 11-22 (1985).
26. J. M. PARK, E.O. LEDBETTER, M.A. SOUTH, S. SRIDAROMONT and R.R. MIRKOVIC, J. Pediatr. 102, 883-885 (1983).

"EFFECT OF PERTUSSIS TOXIN ON THE MUSCARINIC RECEPTOR AFFINITY"

José Luis Boyer^{a,b}
Miguel Martínez-Cárdenas^b
Juan A. Monroy-Sánchez^b
Carlos Posadas^b and
J. Adolfo García-Sáinz^{a,c}

from ^aDepartamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-600, 04510 México, D.F. and ^bDepartamento de Endocrinología, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Juan Badiano No. 1, 14090 México, D.F.

^cTo whom all correspondence should be addressed at: IFC, UNAM; Apartado Postal 70-600; 04510, México, D.F., Telephone: (905) 550-5894.

Running Title: Pertussis toxin and muscarinic receptor affinity.

ABSTRACT

J.L. BOYER, M. MARTINEZ-CARCAMO, J.A. MONROY-SANCHEZ, C. POSADAS AND J.A. GARCIA-SAINZ. "Effect of pertussis toxin on the muscarinic receptor affinity.

The effect of pertussis toxin on the affinity for agonists and antagonists of the heart muscarinic cholinergic receptor was studied using the radiolabeled antagonist [3 H] quinuclidinyl benzylate ([3 H]QNB). In cardiac membranes from control rats the displacement of [3 H]QNB by carbachol was consistent with two classes of binding sites: K_{dH} 25 ± 10 nM and K_{DL} 3006 ± 869 nM; the proportion of sites in the high and low affinity state for agonists were 55% and 45% respectively. In the presence of 100 μ M Guanyl-5'-yl imido diphosphate (Gpp(NH)p), only the low affinity state for agonists was observed (K_{dL} 3404 ± 759 nM). In cardiac membranes from pertussis toxin-treated rats, two binding sites with similar affinities to those seen in the controls were also observed in the absence of guanine nucleotide (K_D 's 39 ± 12 and 3315 ± 845 nM) but the proportion of sites was 20% and 80% in high and low affinity respectively. Gpp(NH)p shifted the remaining 20 percent of sites in high affinity to low affinity state (K_d 4093 ± 744 nM). The receptor K_d for antagonists was decreased by pretreatment with pertussis toxin from 83 ± 7 to 56 ± 5 pM ($p < 0.01$); Gpp(NH)p induced a further change in the affinity for the antagonist in membranes from both control and pertussis toxin-treated rats. The change suggested positive

cooperativity.

The total number of sites was not modified significantly by either pertussis toxin treatment or guanine nucleotides. These results are consistent with a possible reciprocal modulation of the affinity for agonist and antagonist of the cardiac muscarinic cholinergic receptor.

KEY WORDS.

- Heart Muscarinic Receptors
- Pertussis Toxin
- Guanine Nucleotides
- Agonist and Antagonist Binding Regulation

1. INTRODUCTION

The action of many mediators (hormones, neurotransmitters and autacoids) involves modulation of adenylate cyclase activity. This enzyme can be stimulated or inhibited by the receptors for these mediators through their interaction with guanine nucleotide-binding regulatory proteins, termed N_s for the guanine nucleotide-binding regulatory protein involved in stimulation and N_i for that involved in inhibition (Rodbell, 1980). The subunits of these guanine nucleotide-binding regulatory proteins (N_s and N_i) modulate the activity of adenylate cyclase (Gilman, 1984). However, this is not the only function of these proteins. Current ideas (Ross and Gilman, 1980; Asano et al., 1984) indicate that the interaction of receptors with the guanine nucleotide-binding regulatory proteins i.e. formation of a receptor-N complex, results in a significant increase in the receptor affinity for agonists, the binding of GTP to N, in exchange for GDP, favours the dissociation of the receptor-N complex, which leads to the return of the receptor to the lower affinity state for agonist. For most of the receptors no significant change in the affinity for antagonists seems to be produced during this cycle. This has been shown for a variety of receptors coupled in an activatory fashion (i.e. through N_s) or in an inhibitory manner (i.e. through N_i) to adenylate cyclase. Interestingly, the adenylate cyclase-coupled muscarinic cholinergic receptor seems to be rather unique. Some evidence suggests that reciprocal changes in its affinity for agonists and antagonists take place during the cycle of interaction with N_i

(Burgisser et al., 1982; Martin et al., 1984).

Pertussis toxin, one of the toxins produced by *Bordetella pertussis*, is known to block the ability of a large number of receptors (α 2-adrenergic, M2-muscarinic cholinergic, R1-adenosine, D2-dopaminergic, opiate, somatostatin, prostaglandin, nicotinic acid) to mediate inhibition of adenylyate cyclase and the metabolic consequences of such inhibition (Haseki and Ui, 1981; Garcia-Sáinz, 1981; Martínez-Olmedo and Garcia-Sáinz, 1982). The action of pertussis toxin seems to be due to the ADP-ribosylation of a 41kDa protein (Katada and Ui, 1982) or two proteins of 40 and 41 kDa (Malbon et al., 1984). The 41 kDa substrate of pertussis toxin is the α subunit of Ni (Bohoch et al., 1983; Codina et al., 1983). It has also been observed that the action of pertussis toxin on Ni results in a decreased formation of the high affinity state for agonists of receptors that inhibit adenylyate cyclase (Kurose, et al., 1983; Boyer et al., 1984; Garcia-Sáinz et al., 1984; Kurose and Ui, 1984).

We have reported that administration of pertussis vaccine or purified pertussis toxin to rats induces persistent tachycardia and suggested that this effect of the toxin is due to blockade of the action of muscarinic cholinergic receptors (Boyer et al., 1982, 1983). It has been also observed that pertussis toxin, added to cultured heart cells (Haseki and Ui, 1981) or using cardiac membranes (Kurose and Ui, 1984) blocks the ability of the heart muscarinic receptor to inhibit adenylyate cyclase. In the present study we report the effect of pertussis toxin on the affinity state for agonist and antagonist of the heart muscarinic

receptor.

Our results are consistent with a possible reciprocal modulation of the affinity for agonists and antagonists, and with the induction of positive cooperativity for antagonist binding by guanine nucleotides.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Carbachol chloride, guanyl-5'-yl imido diphosphate (Gpp(NH)P), atropine sulfate, oxotremorine sesquifumarate and GTP were obtained from Sigma: (-)-[³H] Quinuclidinylbenzylate ([³H] QNB), 30.2 Ci/m mole was from New England Nuclear Corporation.

2.2 Pertussis Toxin Preparation

Pertussis toxin was purified from whole pertussis vaccine as previously described (Martínez-Olmedo and García-Sáinz, 1983), or by the method of Sekura et al. (1983), by both procedures the toxin was purified approximately 1800-fold with similar purity and potency. The second method was preferred because it is simpler and faster.

2.3 Treatment of Rats with Pertussis Toxin.

Male Wistar rats were injected intraperitoneally with a single dose of pertussis toxin (50 ug/100 g body weight). Control rats were injected with the vehicle used to dissolve the toxin. The rats were killed 3 days after treatment.

2.4 Preparation of Rat Heart Membranes.

Whole heart was quickly removed and rinsed with ice-cold homogenization buffer (containing 20 mM Tris-maleic pH 7.4, 5 mM $MgCl_2$, 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 12.5 mM β -mercaptoethanol), minced and homogenized in 15 volumes of homogenization buffer using a polytron (Brinkmann Instruments) two times for 15 seconds at mild speed. The homogenate was filtered through four layers of cheesecloth, and centrifuged at $700 \times g$ for 15 min; the resultant supernatant was then centrifuged at $30,000 \times g$ for 15 min. The pellet was resuspended in incubation buffer (containing 50 mM Tris, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, pH 7.4) to a protein concentration of 3 mg/ml.

2.4 Radioligand Binding Assay

For saturation experiments plasma membranes (250 ug/tube) were incubated with 0.008 to 1.0 nM [3H]-QNB in a final volume of 3.5 ml at 25°C during 60 min. The membrane suspensions were filtered over Whatman GF/C filters and the filters washed with 20 ml of ice cold incubation buffer. Non specific binding was defined as the binding of [3H]-QNB in the presence of 1 μM atropine, and it was less than 10% of the total binding. Where indicated Gpp(NH)p was present at 100 μM . Competition experiments using unlabeled carbachol or oxotremorine were performed in the same conditions using 0.2 nM [3H]-QNB in the presence or absence of 100 μM Gpp(NH)p. Data from saturation and competition experiments were analyzed by a computer program that performs iterative non-linear regression analysis (Munson and Rodbard,

1990). This program fits binding-data to equations describing the law of mass action for one or two classes of binding sites and determines whether the fit for the two-site model is statistically better than that for one-site model. The output includes the affinity (K_d) as well as the total amount or the relative proportion of each of the sites.

Protein was measured by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard.

3. RESULTS

3.1 Binding Affinity for Agonists.

In agreement with previous reports (Berrie et al., 1977; Rosemberger et al., 1979; Wei and Sulakhe, 1979; Rosemberger et al., 1980; Burgisser et al., 1982; Harden et al., 1982; Kurose and Ui, 1984; Martin et al., 1984), the displacement of [³H]-QNB by the agonist carbachol in heart membranes from control rats, yielded shallow curves (Hill coefficient 0.50 ± 0.02) consistent with the presence of heterogeneous binding sites (Fig. 1A). Computer modelling of these data, indicate the presence of two types of binding sites with different affinities for carbachol (Fig. 1A and Table I). The difference in affinity between these receptors was of approximately 100-fold. We found that 55% of the receptors are in the high affinity state for agonists and 45% in the low affinity state for agonists (see Table 1). In the presence of 100 μ M Gpp(NH)p, the displacement curve was steeper and only the low affinity binding sites were found (Hill coefficient 0.79 ± 0.05). The Kd of these receptors was identical to that of the receptors in the low affinity state for agonist in the absence of guanine nucleotides.

In the membranes from pertussis toxin-treated rats, the computer analysis of the displacement curves for carbachol, in the absence of guanine nucleotides were less shallow than that in the controls (Hill coefficient 0.68 ± 0.002) but also were better fitted to a two-sites model (see Fig. 1B and Table I). The affinities for carbachol were identical to those observed in

control membranes (Table I). However, the proportion of sites in the high affinity state for agonists, was decreased as compared with those found in control rats (Table I). In the presence of guanine nucleotides the displacement curve was steep (Hill coefficient 0.84 ± 0.15) and the goodness of the one-state fit was not significantly improved when the two-states model was tested (Table I).

These results indicate that pertussis toxin treatment decreases the formation of the high affinity state for agonists, as we previously reported for α_2 -adrenoceptors in rat kidney (Boyer et al., 1984) and hamster fat cells (García-Sáinz et al., 1984) an other authors have reported for other models (Kurose et al., 1983; Kurose and Ui., 1984; Evans et al., 1985).

3.2 Binding Affinity for Antagonists.

Saturation experiments with the antagonist [3 H]-QNB in control membranes were saturable, and the Scatchard analysis of the data gave straight lines indicating a single class of non cooperative binding sites (Fig. 2) computer modelling of these data were also in agreement with this statement. Pertussis toxin-treatment induced a significant increase in the receptor affinity for the antagonist (from 83 ± 7 to 56 ± 5 pM in control and Pertussis Toxin treated rats respectively mean \pm S.E.M. of 7 simultaneous experiments ($p < 0.01$) (Fig. 2)). The number of binding sites was not altered by pertussis toxin treatment (171 ± 4 and 191 ± 9 fmol/mg protein in the control and Pertussis Toxin-

treated group respectively). Recently, some reports (Burgisser et al., 1982; Martin et al., 1984) indicate that antagonist binding to the muscarinic cholinergic receptors in several tissues appear to be regulated by guanine nucleotides. Burgisser et al. (1982) have proposed a model for the reciprocal modulation of the binding for agonists and antagonists induced by guanine nucleotides. Interestingly, in the presence of guanine nucleotides the Scatchard plots showed clear deviation from linearity, resulting in downward concavity (Fig. 2). Highly suggestive of positive cooperativity. Curvilinear Scatchard plots were observed in membranes from both, control and pertussis toxin-treated rats, when Gpp(NH)p (Fig. 2) or GTP (not shown) was present.

4. DISCUSSION

The ability of guanine nucleotides to modulate the affinity for agonist of receptors coupled to adenylate cyclase has been extensively documented (Ross and Gilman, 1980; Asano et al., 1984). This effect seems to be mediated through the interaction of the receptors with the guanine nucleotide-binding regulatory proteins. This is strongly supported by the ability of pertussis toxin to ADP-ribosylate the α subunit of G_i and alter the state of affinity of receptors coupled inhibitorily to adenylate cyclase. Our data clearly show that pertussis toxin alters the state of affinity of the heart muscarinic cholinergic receptor. During the course of this study, Kurose and Ui (1984) reported that treatment of membrane preparation of heart tissue with the H protomer of pertussis toxin results in decreased affinity for agonists of the muscarinic receptor. Our results are in agreement with those of Kurose and Ui (1984) but a much more detailed study is presented. Our data not only indicate that the affinity of the receptor for agonist is decreased by the treatment with the toxin. The detailed analysis of our data indicate that the heart muscarinic receptor is in a dynamic equilibrium between two interconvertible states; a high affinity state for agonists (K_d 25-40 nM for carbachol) and a low affinity state (K_d 3-4 μ M for carbachol). Guanine nucleotides (GTP or Gpp(NH)pp) shift this equilibrium towards the low affinity state for agonists. Pertussis toxin-treatment shifts the equilibrium towards the low affinity state; however, in contrast to the absolute shift produced by guanine nucleotides, the toxin causes a partial shift

(Boyer et al., 1984; Garcia-Sainz et al., 1984; Cote et al., 1984) (see Table I). The reason for this is not completely clear at the present but suggests that under our conditions the toxin is not GTP-ribosylating the total amount of Ni in the membrane and allowed us to evidence the transition between both states of affinity. The toxin seems to be inducing the shift in receptor affinity by decreasing the formation of the high-affinity state for agonists. This suggestion is based on the following data: Firstly, it has been shown in different models that the toxin blocks the GTPase activity of Ni (Aktories, et al., 1980; Burns et al., 1983). Secondly, it has been shown that pertussis toxin abolishes the release of GDP (from membranes preloaded with GTP) induced by agents that inhibit adenylate cyclase (Morayama and Ui., 1984). Thus, we could assume that due to the action of pertussis toxin, Ni may be loaded with GTP, which leads to dissociation of the receptor-Ni complex and decreases the receptor affinity for agonists.

Several authors have suggested that the muscarinic cholinergic receptor affinity for agonists and antagonists is modulated in a reciprocal way by guanine nucleotides and that Ni is involved in this effect (Pungisser et al., 1982; Martin et al., 1984). Our data are consistent with this proposal; we observed that pertussis toxin decreased the affinity for agonists and increased the affinity for [³H]-QNB.

However, we were unable to document the presence of sites with different affinity for [³H]-QNB in a binding isotherm. In this regard the data were all-to-nothing, i.e. low affinity in

28

the control saturation isotherm and high affinity induced by pertussis toxin. A possible explanation for this is that the difference in K_d for [PH]-QNB between the low and high affinity states is very small (from 99 ± 7 to 56 ± 5 pM) and possibly beyond the limits of discrimination of the analysis. However, the changes induced by pertussis toxin-treatment were very reproducible.

Kurose and Ui (1984) did not observe any change in antagonist binding. However, only the mean values from twice-repeated experiments are given in that study (Kurose and Ui, 1984). Other authors have observed large differences in the affinities for antagonists (K_{D1} vs K_{D2}) of the muscarinic cholinergic receptor (Burgisser et al., 1982; Martin et al., 1984). In our experiments detailed saturation experiments (in the absence of guanine nucleotide) with concentrations of [PH]-QNB which ranged more than 2-orders of magnitude (0.01 - 5 nM) always resulted in binding isotherms consistent with a single class of binding sites (data not shown).

There is some evidence for the existence of muscarinic cholinergic receptor subtypes; one of them associated with inhibition of adenylate cyclase and the other with phosphoinositide metabolism and calcium mobilization (Hammer and Giachetti, 1982; Brown and Brown, 1984). Interestingly, the affinity for agonists of both subtypes of muscarinic cholinergic receptors are modulated by guanine nucleotides. In a recent, elegant study, Evans et al. (1985) observed that pertussis toxin diminishes the affinity for agonist of the muscarinic cholinergic receptor linked to adenylate cyclase but not that of the receptor

subtype linked to phosphoinositide turnover and calcium mobilization. Unfortunately no data on antagonist binding were presented in that study (Evans et al., 1985). We have previously observed a similar differential effect of pertussis toxin on the affinity for agonists of the kidney- α -adrenergic subtypes: α_1 -adrenergic receptors, not linked to adenylate cyclase, were not affected by the toxin whereas the α_2 -adrenergic receptors, coupled inhibitorily to adenylate cyclase were shifted to the low affinity state for agonists by the toxin (Boyer et al., 1984). These data (Boyer et al., 1984; Evans et al., 1985) suggest that these receptors (α_1 -adrenergic and M_1 cholinergic) are probably coupled to their signal effector system by a different guanine nucleotide-binding regulatory protein (GN) not sensitive to pertussis toxin. The effects of guanine nucleotides on antagonist binding observed in the present study are highly suggestive of positive cooperativity. Several authors have previously reported a similar observation (Mattersa et al., 1985; Boyer et al., 1985). The functional significance of this effect is not clear at this moment, as well as the site of action of guanine nucleotides. The experiments using membranes from Pertussis Toxin-treated rats suggest (but do not prove) that proteins other than N_i may be involved. However, a more detailed characterization of this effect is needed. Studies are in progress to characterize this effect in our laboratory.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to thank Ms. Guadalupe Ramirez for typing the manuscript and the authorities of the National Institute of Hygiene and the General Administration of Biologics (Secretaria de Salud) for the donation of vaccine concentrates. This research was partially supported by a Grant from CONACULT (PCSBABIA 22620). J. O. Garcia-Sainz is a 1925 Guggenheim Fellow.

REFERENCES

- Akterides, K., G. Schultz and K.H. Jakobs, 1983, Adenylate cyclase inhibition and GTPase stimulation by somatostatin in S49 lymphoma cells. Variants are prevented by islet-activating protein, *FEBS Lett.* 122, 149.
- Asano, T., T. Katada, A.G. Gilman and E.M. Ross, 1984, Activation of the inhibitory GTP-binding protein of adenylate cyclase, Gi, by adrenergic receptors in reconstituted phospholipid vesicles, *J. Biol. Chem.* 259, 2351.
- Barris, C.P., H.J.M. Birchall, A.G.H. Burgon and E.C. Hulme, 1979, Guanine nucleotides modulate muscarinic receptor binding in the heart, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 1988.
- Bokoch, S.M., T. Katada, J.K. Northup, E.L. Hewlett and A.G. Gilman, 1982, Identification of the predominant substrate for GTP-ribosylation by islet activating protein, *J. Biol. Chem.* 257, 2072.
- Boyer, J.L., C. Cárdenas, C. Posadas and J.A. García-Sáinz, 1983, Pertussis toxin induces tachycardia and impairs the increase in blood pressure produced by alpha₂-adrenergic agonists, *Life Sci.* 22, 2207.
- Boyer, J.L., A. García, C. Posadas and J.A. García-Sáinz, 1984, Differential effect of pertussis toxin on the affinity state for agonist of renal alpha₁ and alpha₂-adrenoceptors, *J. Biol. Chem.* 259, 2074.
- Boyer, J.L., C. Posadas and J.A. García-Sáinz, 1982, Effect of pertussis vaccine on alpha-adrenoceptors of the circulatory system of the rat, *Eur. J. Pharmacol.* 22, 123.
- Boyer, J.L., M. Martínez-Cárdeno, J.A. Monroy-Sánchez, C. Posadas and J.A. García-Sáinz, 1984, Guanine nucleotide-induced positive cooperativity in muscarinic-cholinergic antagonist binding, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
- Brown, J.H. and S.L. Brown, 1984, Agonists differentiate muscarinic receptors that inhibit cyclic AMP formation from those that stimulate phosphoinositide metabolism, *J. Biol. Chem.* 259, 2777.
- Burgisser, E., A. de Lean and R.J. Lefkowitz, 1982, Reciprocal modulation of agonist and antagonist binding to muscarinic cholinergic receptor by guanine nucleotide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 1722.
- Burns, D.L., E.L. Hewlett, J. Moss and M. Vaughan, 1983, Pertussis toxin inhibits enkephalin stimulation of GTPase of NG109-15 cells *J. Biol. Chem.* 258, 1435.

- Codina, J., J. Hildebrandt, R. Iyengar, L. Birnbaumer, R. Sekura and C.R. Manclark, 1983, Pertussis toxin substrate, the putative Ni component of adenylyl cyclases, is an alpha beta heterodimer regulated by guanine nucleotide and magnesium, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 4276.
- Cote, T.E., E.A. Frey and R. Sekura, 1984, Altered activity of the inhibitory guanyl nucleotide-binding component (Ni) induced by Pertussis toxin, J. Biol. Chem. 259, 8693.
- Evans, T., M.W. Martin, A.R. Hughes and T.K. Harden, 1985, Guanine nucleotide-sensitive, high affinity binding for carbachol to muscarinic cholinergic receptors of 1321N1 astrocytoma cells is insensitive to pertussis toxin, Mol. Pharmacol. 27, 32.
- García-Sáinz, J.A., 1981, Decreased sensitivity to alpha₂-adrenergic amines, adenosine and prostaglandins in white fat cells from hamsters treated with pertussis vaccine, FEBS Lett. 126, 306.
- García-Sáinz, J.A., J.L. Boyer, T. Michel, D. Sawyer, G.L. Stiles, H. Dohlmán and R.J. Lefkowitz, 1984, Effect of pertussis toxin on alpha₂-adrenoceptors: decreased formation of the high-affinity state for agonists, FEBS Lett. 172, 95.
- Gilman, A.G., 1984, Guanine nucleotide-binding regulatory proteins and dual control of adenylate cyclase, J. Clin. Invest. 73, 1.
- Hammer, R. and A. Giachetti, 1982, Muscarinic receptor subtypes: M₁ and M₂ biochemical and functional characterization, Life Sci. 31, 2991.
- Harden, T.K., A.G. Scheer and M.M. Smith, 1982, Differential modification of the interaction of cardiac muscarinic and beta-adrenergic receptors with guanine nucleotide binding component(s), Mol. Pharmacol. 21, 570.
- Hazeki, O., and M. Ui, 1981, Modification by islet-activating protein of receptor-mediated regulation of cyclic AMP accumulation in isolated rat heart cells, J. Biol. Chem. 256, 2856.
- Hildebrandt, J.D., J. Codina, R. Risinger and L. Birnbaumer, 1984, Identification of a subunit associated with the adenylyl cyclase regulatory proteins Ns and Ni. J. Biol. Chem. 259, 2039.
- Katada, T., and M. Ui, 1982, Direct Modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 3129.

- Kurose, H., T. Katada, T. Amano and M. Ui, 1983, Specific uncoupling by islet-activating protein, pertussis toxin, of negative signal transduction via alpha-adrenergic, cholinergic and opiate receptors in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J. Biol. Chem.* 258, 4870.
- Kurose, H., and M. Ui, 1983, Functional uncoupling of muscarinic receptors from adenylate cyclase in rat cardiac membranes by the active component of islet-activating protein, pertussis toxin, *J. Cyc. Nucl. Prot. Phosph. Res.* 9, 305.
- Louvy, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- Malbon C.C., P.J. Rspiejko and J.A. Garcia-Sáinz, 1984, Pertussis toxin catalyzes the ADP-ribosylation of two distinct peptides, 40 and 41 kDa, in rat fat cell membranes. *FEBS Lett.* 176, 301.
- Martin, M.W., M.M. Smith and T.K. Harden, 1984, Modulation of muscarinic cholinergic receptor affinity for antagonist in rat heart, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230, 424.
- Martínez-Dimedó, M.A. and J.A. García-Sáinz, 1983, Effect of pertussis toxin on the hormonal regulation of cyclic AMP levels in hamster fat cells. *Biochim. Biophys. Acta* 750, 215.
- Mattera, R., B.J.R. Pitts, M.L. Entman and L. Birnbaumer, 1985, Guanine nucleotide regulation of a mammalian myocardial muscarinic receptor system. *J. Biol. Chem.* 260, 7410.
- Munson, P.J. and D. Rodbard, 1980, Ligand: A versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal. Biochem.* 107, 220.
- Murayama, T., and M. Ui, 1984, [³H]GDP release from rat and hamster adipocyte membranes independently linked to receptors involved in activation or inhibition of adenylate cyclase, *J. Biol. Chem.* 259, 751.
- Rodbell, M. 1980, The role of hormone receptors and GTP regulatory proteins in membrane transduction, *Nature* 284, 17.
- Rosemberger, L.B., W.R. Roeske and H.I. Yamamura, 1979, The regulation of muscarinic cholinergic receptors by guanine nucleotides in cardiac tissue. *Eur. J. Pharmacol.* 56, 179.
- Rosemberger, L.B., H.I. Yamamura, and W.R. Roeske, 1980, Cardiac muscarinic cholinergic receptor binding is regulated by Na⁺ ions and guanyl nucleotides. *J. Biol. Chem.* 255, 820.
- Ross, E.M. and B.G. Gilman, 1980, Biochemical Properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 533.

Sekura, R.D., F. Fish, C.R. Manclark, B. Meade and Y. Zhang, 1993, Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase, J. Biol. Chem. 268, 14647.

Wei, J. and P.V. Shulakhe, 1979, Agonist-antagonist interactions with rat atrial muscarinic cholinergic receptor sites: differential regulation by guanine nucleotides, Eur. J. Pharmacol. 53, 91.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. EFFECT OF PERTUSSIS TOXIN TREATMENT ON THE DISPLACEMENT BY CARBACHOL OF SPECIFIC [3H]ICNB BINDING IN THE PRESENCE AND ABSENCE OF Gpp(NH)p.

Displacement experiments were performed as described under "Materials and Methods" in heart membranes obtained from control (A) and pertussis toxin-treated rats (B), in the absence (closed circles) and presence (open circles) of 100 μ M Gpp(NH)p (the insets show the Hill analysis of the competition studies). The data shown are the means \pm S.E. of five separate experiments.

Fig. 2. EFFECT OF PERTUSSIS TOXIN TREATMENT ON [3H]ICNB BINDING TO RAT HEART MEMBRANES.

Binding experiments were performed as described under "Materials and Methods" in the absence (closed circles) and in the presence (open circles) of 100 μ M Gpp(NH)p using heart membranes from control (A) and pertussis toxin-treated rats (B). The insets show the Scatchard analysis of the binding isotherms. The data shown are representative experiments of 7 performed in each case with similar results.

TABLE I

Effect of Pertussis Toxin on the Affinity for Agonists and on the Proportion of Sites in High and Low Affinity State.

Agonist competition experiments were performed and calculated as described under "Materials and Methods". Values are the means \pm S.E. of five separate experiments.

	Control	Pertussis Toxin	Control Spp(100)p	Pertussis Toxin Spp(100)p
K _{DH} (nM)	25 \pm 10	39 \pm 12	-----	-----
K _{DL} (nM)	3004 \pm 249	3215 \pm 345	3404 \pm 759	4073 \pm 744
R _H (%)	55 \pm 2	20 \pm 3*	-----	-----
R _L (%)	45 \pm 2	80 \pm 3*	100	100

*p < 0.001 vs control.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. EFFECT OF PERTUSSIS TOXIN TREATMENT ON THE DISPLACEMENT BY CARBACHOL OF SPECIFIC $[^3\text{H}]$ QNB BINDING IN THE PRESENCE AND ABSENCE OF Gpp(NH)p.

Displacement experiments were performed as described under "Materials and Methods" in heart membranes obtained from control (A) and pertussis toxin-treated rats (B), in the absence (closed circles) and presence (open circles) of $100 \mu\text{M}$ Gpp(NH)p (the insets show the Hill analysis of the competition studies). The data shown are the means \pm S.E. of five separate experiments.

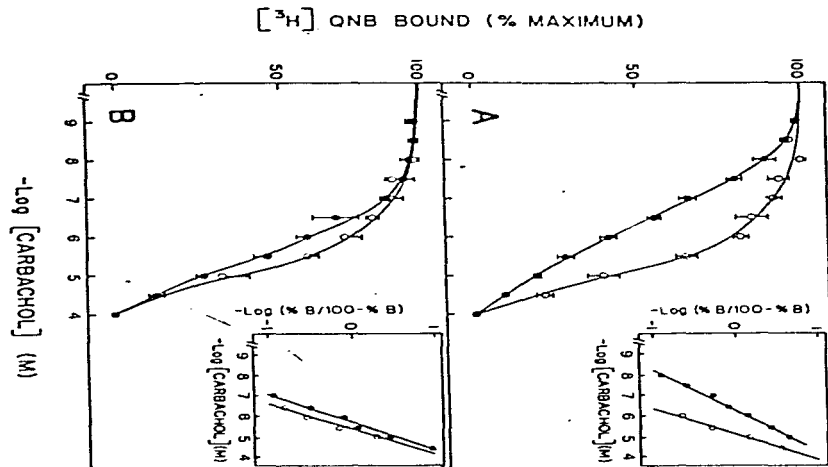


Fig. 2. EFFECT OF PERTUSSIS TOXIN TREATMENT ON ETHOZINB BINDING TO RAT HEART MEMBRANES.

Binding experiments were performed as described under "Materials and Methods" in the absence (closed circles) and in the presence (open circles) of $100 \mu\text{M}$ Gpp(NH)p using heart membranes from control (A) and pertussis toxin-treated rats (B). The insets show the Scatchard analysis of the binding isotherms. The data shown are representative experiments of 7 performed in each case with similar results.

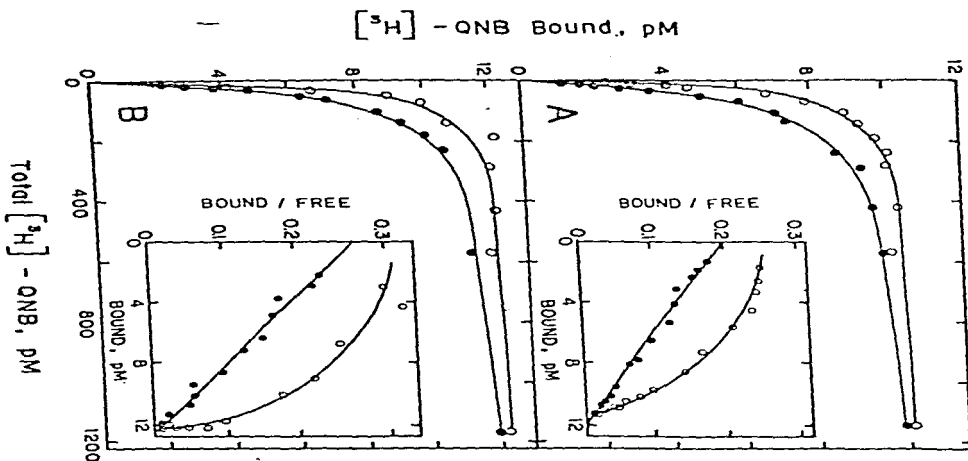


Fig. 2

GUANINE NUCLEOTIDE-INDUCED POSITIVE COOPERATIVITY
IN MUSCARINIC-CHOLINERGIC ANTAGONIST BINDING

José Luis Boyer^{a,b}, Miguel Martínez-Cárcamo^b, J. Antonio Monroy-Sánchez^b,
Carlos Posadas^b and J. Adolfo García-Sáinz^a.

^aDepartamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Apartado Postal 70-600, 04510, México, D.F.

^bDepartamento de Endocrinología,
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez";
Juan Badiano # 1, 14080, México, D.F.

Received November 22, 1985

The effect of guanine nucleotides on the binding of [³H]Quinuclidinyl benzilate to heart muscarinic receptors was studied. It was observed that GTP and Gpp(NH)p increased antagonist binding. Scatchard transformation of the data resulted in curvilinear plots (downward concavity) consistent with positive cooperativity. Graphic analysis for cooperativity indicated that guanine nucleotides: a) increased slightly but consistently the affinity for the antagonist (independent of receptor occupancy) and b) induce positive cooperativity in the binding of [³H]QNB (dependent of receptor occupancy). © 1986 Academic Press, Inc.

Heart muscarinic-cholinergic receptors are responsible of modulating heart rate. Activation of these receptors result in inhibition of adenylate cyclase, decreased levels of cyclic AMP and changes in ion conductance (1). It is well known that receptors coupled to adenylate cyclase exist in two interconvertible affinity states for agonists. Such interconversion of the affinity state for agonists seems to reflect the interaction with the guanine-nucleotide regulatory proteins and therefore is modulated by guanine-nucleotides (2). Thus, it has been shown that guanine nucleotides shifts the equilibrium between the affinity states of the receptors towards the low affinity state for agonists (3,4). This has also been shown for cholinergic muscarinic receptors (5-9) although the existence of 3 affinity states for agonists has been proposed (10). Interestingly, guanine nucleotides seem to modulate not only

*To whom correspondence should be addressed.

The state of
also for ant
fect of guan
([³H]QNB),
sults indic.
with the re.
cooperativit

Guanyl
obtained fr
Male W
exanguinate
zation buff
EDTA, 12.5
of homogeni
for 15 sec
of cheesecl
nantant was
pended in 1
pH 7.4) to
Plasma
[³H]QNB in
sions were
of ice cold
of [³H]QNB
total bindi
was measure
standard. A
and the pos
Roth (14).

[³H]QNB
isotherm is
(Figs. 1 or
196 + 14 in
each case).
(p < 0.001)
of GTP (Fig
affect the
increased i
became muc
(9). In noi

the state of affinity of the muscarinic cholinergic receptors for agonists but also for antagonists, in a reciprocal fashion (9, 11). We have studied the effect of guanine nucleotides on the binding of [³H]Quinuclidinyl benzilate ([³H]QNB), a cholinergic antagonist, to heart muscarinic receptors; our results indicate that guanine nucleotides changes the interaction of the ligand with the receptor in a complex fashion consistent with the induction of positive cooperativity.

MATERIALS AND METHODS

Guanylyl-5-yl imido diphosphate (Gpp(NH)p), GTP and atropine sulfate were obtained from Sigma. (-)[³H]QNB (37.2 Ci/mole) was from New England Nuclear.

Male Wistar rats (200-250 g) were sacrificed by decapitation and exanguinated. The heart was quickly removed and washed with ice-cold homogenization buffer (containing 20 mM tris-maleic, 5 mM MgCl₂, 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 12.5 mM β-mercaptoethanol, pH 7.4), minced and homogenized in 15 volumes of homogenization buffer using a polytron (Brinkmann Instruments) two times for 15 seconds at mild speed. The homogenate was filtered through four layers of cheesecloth, and centrifuged at 700 × g for 15 min; the resultant supernatant was then centrifuged at 30,000 × g for 15 min. The pellet was resuspended in incubation buffer (containing 50 mM tris, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 7.4) to a protein concentration of 3 mg/ml.

Plasma membranes (200-250 ug/tube) were incubated with 0.008 to 2.0 nM [³H]QNB in a final volume of 3.5 ml at 25°C during 60 min. The membrane suspensions were filtered over Whatman GF/C filters and the filters washed with 20 ml of ice cold incubation buffer. Non specific binding was defined as the binding of [³H]QNB in the presence of 1 μM atropine, and it was less than 10% of the total binding. Where indicated Gpp(NH)p or GTP were present at 100 μM. Protein was measured by the method of Lowry et al (12) using bovine serum albumin as standard. Analysis of the data was performed by the method of Scatchard (13) and the possibility of cooperativity by the graphic analysis of De Meyts and Roth (14).

RESULTS

[³H]QNB binds rapidly and reversibly to cardiac membranes. A saturation isotherm is presented in Figs. 1 and 2 panel A. Scatchard analysis of the data (Figs. 1 and 2 panel B) indicated that the K_D was 63 ± 3 pM and the B_{max} 196 ± 14 fmol/mg of protein (mean ± S.E.M. of 6 experiments in duplicate in each case). Linear regression analysis was consistent with a straight line (p < 0.001) and correlation coefficients of 0.98-0.99. Interestingly, addition of GTP (Fig. 1) or the hydrolysis resistant analogue Gpp(NH)p (Fig. 2) markedly affect the ligand receptor interaction; in both cases guanine nucleotides increased [³H]QNB binding and the ascending part of the saturation curves became much steeper. Similar results have been observed by Burgisser et al (9). In none of these cases the Scatchard transformation of the data gave

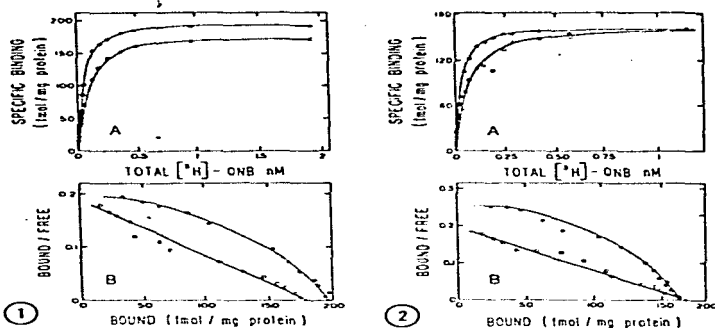


Figure 1. SATURATION ISOTHERM (A) AND SCATCHARD PLOT (B) OF $[^3\text{H}]$ QNB BINDING TO CARDIAC MEMBRANES IN THE ABSENCE (○) AND PRESENCE (●) OF GTP. Plotted is a representative experiment out of 10 with identical results. Each point is the average of duplicate determinations with less than 10% variation.

Figure 2. SATURATION ISOTHERM (A) AND SCATCHARD PLOT (B) OF $[^3\text{H}]$ QNB BINDING TO CARDIAC MEMBRANES IN THE ABSENCE (○) AND PRESENCE (●) OF Gpp(NH)p. Other indications as in Figure 1.

straight lines but were clearly curvilinear, i.e. downward concave (Figs. 1 and 2 panel B), suggesting the existence of positive cooperativity in the presence of guanine nucleotides (15).

In order to overcome the problems due to the possible existence of site-site interactions and to obtain meaningful information the data were replotted using the graphic analysis of De Meyts and Roth (14). In this analysis the average affinity (\bar{K}) calculated as $(\text{Bound}/\text{free})/(\text{Dmax}-\text{B})$ is plotted as a function of the fractional occupancy (B/Dmax). Using this graphical analysis the differences seen in this Scatchard plots were more clearly observable. In the absence of guanine nucleotides the \bar{K} was constant indicating the absence of cooperativity (Fig. 3). On the contrary in the presence of GTP (Fig. 3, panel A) or Gpp(NH)p (Fig. 3 panel B) the average affinity varied markedly (from 20 to 100 nM^{-1} i.e. the KDs varied between 50 to 10 μM) as a function of receptor occupancy. As shown in Fig. 3, in the presence of guanine nucleotides, as the receptor occupancy increased the average affinity increased. Calculation

of the
follow
presen
consis

1
the b:
choli:
Scatcl
tivity:
on an
most
been
(prob
assay
prese
under

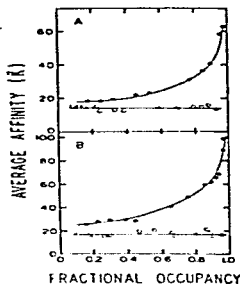


Figure 3. GRAPHIC ANALYSIS FOR COOPERATIVITY OF THE DATA PRESENTED IN FIG. 1 (A) AND FIG. 2 (B). Open symbols indicate the absence of guanine nucleotides and closed symbols indicate the presence of 100 μ M GTP (panel A) or 100 μ M Cpp(NH)p (panel B). (K units are: nM^{-1})

of the Hill coefficients n_H^k as indicated by De Lean and Rodbard (15) gave the following results: 1.0 in the absence of guanine-nucleotides, 1.46 in the presence of GTP and 1.50 in the presence of Cpp(NH)p. These results are clearly consistent with guanine nucleotide-induced positive cooperativity.

DISCUSSION

The main finding of our studies is the effect of guanine nucleotides on the binding of a cholinergic antagonist, [3 H]QNB, to the heart muscarinic-cholinergic receptors. Our results clearly show a downward concavity in the Scatchard analysis of the saturation isotherm consistent with positive cooperativity. Previously other authors had studied the action of guanine nucleotides on antagonist binding to muscarinic cholinergic receptor (5, 7-9, 11, 16). In most instances an increase in antagonist affinity by guanine nucleotides has been reported without detecting changes in the shape of the Scatchard plots (probably due to a small range of radioligand concentrations used in their assays). However, in some cases in which straight Scatchard plots were presented, careful inspection of the data evidenced downward concavity (17,18).

A graphic analysis (14) was successfully used to further document the underlying phenomenon responsible for the curvilinearity of the Scatchard

plots. The data are markedly similar to the theoretical plots for positive cooperativity (14). It should be mentioned that, as expected, the process of positive cooperativity is dependent on receptor occupancy (see Fig. 3) and not just an increase in receptor affinity for antagonists. Burgisser *et al* (9) have proposed that guanine nucleotides modulate in an opposite fashion the affinity of muscarinic receptors for agonists and antagonists, i.e. decrease the affinity for agonists whereas increase that for antagonist. This phenomenon does not depend on receptor occupancy. Our results do not allow us to discard the proposed reciprocal modulation of affinity. On the contrary, we consistently observed that the average affinity (\bar{K}) at the lowest receptor occupancies (5-15%), was higher in the presence of guanine nucleotides than in their absence. The change in affinity due to guanine nucleotides was small (i.e. from a K_D of 60 μ M to a K_D of 50 μ M in the absence and presence of guanine nucleotides, respectively). Other authors have mainly interpreted their data on the effect of guanine nucleotides as the results of an increase in affinity. As already mentioned, it is very possible that both processes (i.e. increase in affinity and positive cooperativity) may coexist.

The effects of guanine nucleotides on the affinity of receptors seem to take place through the guanine nucleotide regulatory proteins (Ni, Ns and Nx) (2). Current ideas indicate that the receptor-N (regulatory protein) complex is the form of the receptor with high affinity for agonists (and low affinity for antagonist in the case of the muscarinic receptors). Guanine nucleotides seem to dissociate the receptor-N complex and decrease the affinity for agonist (and increase that for antagonists in muscarinic receptors). It is possible that the induction of positive cooperativity by guanine nucleotides observed in the present study may result from receptor dissociation of the guanine nucleotide regulatory protein. However, more direct approaches are required to address this possibility.

After this research was finished, a paper appeared describing similar effects of guanine nucleotides on antagonist binding (19).

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was partially supported by a Grant from CONACyT (PCSAENA-22620). The authors thank Ms. Guadalupe Ramirez for skillfully typing the manuscript. J. A. Garcia-Sáinz is a 1985-1986 Guggenheim Fellow.

REFERENCES

1. Pappano, A.J., and Inoue, D. (1984) *Fed. Proc.* 43, 2607-2612.
2. Rodbell, M. (1980) *Nature* 284, 17-22.
3. Hoffman, B.B., Michel, T., Brennan, T.B., and Lefkowitz, R.J. (1982) *Endocrinology* 110, 926-932.
4. Michel, T., Hoffman, B.B. and Lefkowitz, R.J. (1980) *Nature* 288, 709-711.
5. Burrie, C.P., Birdsall, N.J.M., Burgen, A.S.B., Hulme, E.C. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 1000-1005.
6. Rosenberg, L.B., Roeske, W.R., Yamamura, H.I. (1979) *Eur. J. Pharmacol.* 56, 179-180.
7. Hulme, E.C., Burrie, C.P., Birdsall, N.J.M. and Burgen, A.S.V. (1981) *Eur. J. Pharmacol.* 73, 137-142.
8. Ehlert, F.J., Roeske, W.R. and Yamamura, H.I. (1981) *Fed. Proc.* 40, 153-159.
9. Burgisser, E., De Lean, A. and Lefkowitz, R.J. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1732-1736.
10. Birdsall, N.J., Burgen, A.S.V., and Hulme, E.C. (1978) *Mol. Pharmacol.* 14, 726-736.
11. Martin, M.W., Smith, M.M. and Harden, K.T. (1984) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230, 424-430.
12. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
13. Scatchard, G. (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660-672.
14. De Meyts, P. and Roth, J. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 1118-1126.
15. De Lean, A. and Rodbard, D. (1979) In *The Receptors A Comprehensive Treatise* (O'Brien, R.D. Ed.), vol. 1, pp 143-192. Plenum Press, New York and London.
16. Hoxey, M.M. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 314-321.
17. Murphy, K.M.M. and Satre, A. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 280-285.
18. Cheng, J.B. and Townley, R.G. (1983) *Eur. J. Pharmacol.* 88, 269-272.
19. Matters, R., Pitts, B.J.R., Entwain, M.L. and Birnbaumer, L. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 7410-7421.

Los efectos de los nucleótidos de guanina se ejercen a través de su interacción con proteínas reguladoras que ocupan funcionalmente el receptor con el sistema encargado de la generación del segundo mensajero (cG, cAMP). Estas proteínas además participan en la regulación del estado de afinidad del receptor, probablemente mediante la inducción de cambios conformacionales. Estos resultados sugieren que debe existir un ciclo de regulación en el estado de afinidad del receptor, acoplado al ciclo de activación / inhibición de la adenilato ciclasa (ver figura 1 y 2). En condiciones normales, los receptores presentan dos estados de afinidad para agonistas, alta y baja afinidad; la formación del complejo RII-GTP induce en el receptor una conformación de baja afinidad para agonistas, mientras que el complejo RII-GDP formado como consecuencia de la hidrólisis del GTP (ver figura 2), induce en el receptor la conformación de alta afinidad.

En las condiciones de nuestros experimentos la presencia del GTP o de sus análogos no hidrolizables, al complejarse el equilibrio hacia la formación del complejo RII-GTP; convierte a la totalidad de los sitios de la conformación de baja afinidad.

De acuerdo con lo anterior, los datos del primer trabajo (Ref. 1977), confirman la participación de una proteína reguladora, en este acoplado a los receptores alfa-adrenérgicos como se ha establecido previamente, sino que también señala la presencia de una proteína reguladora dependiente de nucleótidos de guanina acoplada a los receptores

alfamadrénérgico. En este trabajo, también se observó que la toxina portulaca se opone de interferir con la regulación del estado de afinidad del receptor alfa-madrénérgico para los agonistas.

Los principales efectos producidos por la toxina portulaca, mediante la GDP ribosilación de la proteína M1 son: 1) el bloqueo de la capacidad inhibitoria del receptor alfa-madrénérgico sobre la adenilato ciclasa; 2) el bloqueo de la actividad de GTPasa de la proteína M1 y el probable cambio en la conformación del receptor hacia el estado de baja afinidad.

De acuerdo con la autoritar (ver figura 2) se puede postular que la toxina portulaca produce estos efectos mediante el bloqueo de la inhibición del complemento funcional entre la proteína M1 y la adenilato ciclasa. Esta hipótesis está apoyada por los siguientes evidencias: 1) la toxina portulaca induce un estado de baja afinidad del receptor para agonistas, compatible con el "congelamiento" del sitio de acoplaje M1-GTP (figura 2), favorecido además por el bloqueo de la actividad de GTPasa (12); 2) la actividad basal de la adenilato ciclasa no se modifica significativamente por el tratamiento con la toxina portulaca, como ha sido informado por nosotros y por otros investigadores (10, 11, 12, 13). Si la acción de la toxina portulaca, fuera debida, como sucede con la toxina del cólera (14), al bloqueo de la actividad de GTPasa de la proteína M1 y no al complemento funcional entre M1 y la adenilato ciclasa, el complejo estaría en un estado permanentemente "activado", lo que mantendría constantemente inhibida la actividad de la enzima,

hecho que no sucede. Se requieren de estudios adicionales para determinar si la hipótesis anterior es correcta.

En este estudio observamos que la modulación del estado de afinidad del receptor α_1 -adrenérgico no fue susceptible de modificación alguna por el tratamiento con la toxina pertussis, lo que sugiere que la regulación del estado de afinidad de los receptores α_1 y α_2 -adrenérgicos por los nucleótidos de guanina, se ejerce a través de entidades moleculares diferentes.

La proteína G es una proteína reguladora dependiente de nucleótidos de guanina, insensible a la toxina pertussis y acoplada a receptores, cuyo mecanismo de transducción no involucra a la adenilato ciclasa. Fue informado por primera vez en este trabajo, y ha sido posteriormente confirmado por otros investigadores utilizando sistemas diferentes (102, 173).

En este estudio, se observó también que el tratamiento con la toxina pertussis no produjo cambio en la afinidad del receptor por los antagonistas de los dos subtipos de receptores, ni en el número de sitios de unión. Por otra parte, los nucleótidos de guanina no modificaron estos parámetros en los receptores α_1 -adrenérgicos, mientras que en los α_2 , se observó un pequeño aumento en el número de sitios de unión, sin cambios en la afinidad por el antagonista, lo que parece señalar que la disminución del estado de afinidad producido por el nucleótido de guanina, libera alguna fracción de agonista endógeno que permanece unido en la preparación, aumentando la disponibilidad de sitios de unión para el radioligando.

Previamente informamos que la administración de la toxina pertussis produce en la rata un incremento de la frecuencia

cardíaca que persiste después de 10 días de la administración de una dosis de la toxina (112). La hipótesis planteada en base a nuestras observaciones fue que el aumento en la frecuencia cardíaca era debido a un bloqueo de la acción de los receptores colinérgicos muscarínicos del corazón, mediadora de la respuesta electrofisiológica negativa. En el segundo trabajo preferencial (137) se concluyó esta hipótesis.

El tratamiento con la toxina pertussis, impidió la disminución en la frecuencia cardíaca inducida por la estimulación eléctrica del Apg. La inhibición de la actividad de la adenilato ciclase en respuesta a la estimulación del receptor muscarínico también fue bloqueada por la administración de la toxina y, finalmente, el tratamiento con la toxina pertussis produjo una disminución en el estado de afinidad del receptor muscarínico para agonistas, sin que el número total de receptores se modificara. Es probable que el mismo mecanismo de acción de la toxina pertussis propuesto para los receptores alfa₁-adrenérgicos también sea el responsable de las acciones de la toxina sobre el corazón.

En otros experimentos, la actividad basal de la adenilato ciclase no se modificó por la administración de toxina pertussis, como previamente se lo demostró (135, 112, 113, 124), mientras que la magnitud de la estimulación producida por los receptores beta₁-adrenérgicos no incrementó significativamente y fue más sensible a la acción del propranolol, (112, 138) del trabajo. En la actualidad no se conoce el mecanismo a través del cual sucede este fenómeno, es probable que el tratamiento con la toxina

particular modifique la distribución de la subunidad α de NI, alterando la disponibilidad del complejo $\beta\delta$ de tal manera que se favorezcan las acciones estrictas de la proteína No.

Las observaciones realizadas en el presente trabajo pueden tener validez desde el punto de vista clínico. Recientemente, se informó en la literatura (17) el caso de un niño que presentó un episodio de taquicardia supraventricular paroxística, pocas horas después de la administración de la vacuna DFT. Posteriormente, se demostró que este caso que el componente particular de la vacuna DFT fue el responsable de la taquicardia observada después de la vacunación (17). Entre los efectos adversos de la vacuna particular, se encuentran la sedación, palpitaciones, crisis de llanto y la fiebre que surge en estado de choque. Algunos de estos efectos pueden constituir la expresión clínica de un episodio de taquicardia supraventricular paroxística (18). No existen informes en la literatura en relación a los efectos de la vacuna particular sobre posibles alteraciones en el sistema de conducción del corazón.

En el presente estudio se observaron resultados en estudio que mostraron un 100% de eficacia clínica tanto a las que se les midió la frecuencia cardíaca tanto antes como 1 hora y 24 horas después de la administración de la primera dosis de la vacuna DFT. En 39 casos no presentó fiebre después de la vacunación y fueron excluidos del estudio. De los 17 restantes, en 12 (68%) la frecuencia cardíaca aumentó en más de 20 latidos por minuto respecto al valor previo a la vacunación (41 \pm 3.2 \pm 2.2) a las 0 horas y 30.9 \pm 4 latidos por minuto a las 24 hrs. después de la administración de la vacuna. En cuatro casos el incremento en la

frecuencia cardíaca fue superior a 70 latidos por minuto. En un caso se observó a las 2 horas después de la administración de la vacuna un bloqueo de la zona derecha del corazón, que desapareció a las 24 horas.

Es importante saber si los niños que presentan alteraciones en el sistema de conducción son más susceptibles al efecto cronotrópico positivo de la toxina portuensis. En este punto el caso, de acuerdo con nuestras observaciones, la taquicardia sería fácilmente controlada con el caso informado en la literatura (172), mediante la administración de pequeñas dosis de un bloqueador de las conexiones beta adrenérgicas. Estas observaciones destacan la importancia de disponer de una vacuna contra la toxina portu. Se está realizando un esfuerzo por obtener una vacuna preparada (181).

El tratamiento con la toxina portuensis produce una disminución de la proporción de sitios en alta afinidad y un aumento en la proporción de sitios en baja afinidad para agonistas, estos cambios se manifiestan como una disminución aparente de la constante de afinidad del receptor para los agonistas. Este efecto se observó tanto en los receptores alfa-adrenérgicos como en los receptores beta-adrenérgicos musculares del corazón. En los receptores musculares, la diferencia de la observada con los receptores alfa-adrenérgicos del corazón (170) y del tejido adiposo (172), el tratamiento con la toxina portuensis también modifica el estado de afinidad del receptor para los antagonistas.

En el tercer trabajo (referencia 182) observamos que el

tratamiento con la levina portuguesa produjo un aumento significativo en la afinidad del receptor muscarínico para los antagonistas. Estos efectos son consistentes con el modelo de modulación alostérica propuesto por Scatchard, en 1962 (1970). Posteriormente, Marden y colaboradores (1980), empleando otros factores que modifican el estado de afinidad del receptor muscarínico del ovario, han proporcionado evidencias que apoyan este modelo. El análisis de estos datos en conjunto, parecen respaldar la interacción del receptor, ya sea ocupado por un agonista o un antagonista con la proteína reguladora III (Figura 6).

En nuestros experimentos, la presencia de las nucleótidos de guanina protege los receptores expresados en el estado de afinidad del receptor para los agonistas (una disminución, al convertir el 100% de las sitios de unión al estado de baja afinidad). Sin embargo, el efecto de las nucleótidos de guanina sobre el estado de afinidad del receptor para los antagonistas fue más complejo. En ausencia de nucleótidos de guanina, el análisis de los receptores de unión del radioligando por el método de Scatchard, produjo valores que se ajustaron perfectamente a una línea recta (Fig. 6B,C,D), sugiriendo que una población homogénea de sitios de unión independientes. En presencia de GTP y de su análogo no hidrolizable, el Gp,MMOP, la transformación de Scatchard produjo valores que conductos como una línea abaja, altamente sugestiva de un fenómeno de cooperatividad positiva. En el último trabajo (referencia 10) se muestran los datos iniciales en la caracterización de este efecto:

Para documentar la presencia de cooperatividad positiva se

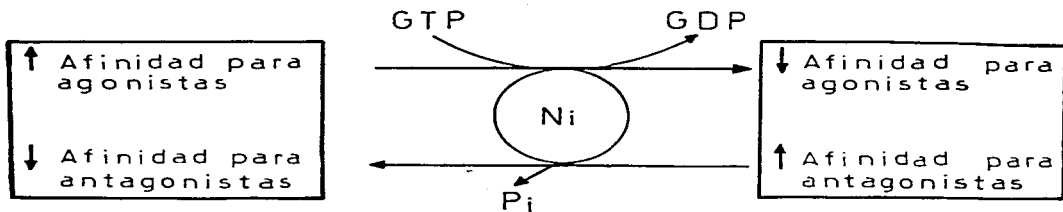


Figura 6. Modelo de Regulación recíproca de la afinidad para agonistas y antagonistas de los receptores colinérgicos muscarínicos del corazón.

empleó el método descrito por De Meyle y Roth (1968): esta método consiste en evaluar, para cierta susceptibilidad fraccional, la afinidad intrínseca que tendría el receptor si se tratara de una población igual de receptores independientes (no cooperativos) a la misma susceptibilidad fraccional, lo que nos permite evaluar fácilmente cuál es la afinidad del receptor cuando nivel de susceptibilidad. Este análisis revela que las nucleótidos de guanina inducen un fenómeno de cooperatividad positiva (dependientemente de la susceptibilidad) en la unión de antagonistas al receptor colinérgico muscarínico (cuando estas experimentos hubiese sido terminados), y el mecanismo es propuesto para ser similar a publicado, apropiado publicando un trabajo del grupo de Birnbaumer y colaboradores (1977), la forma de el mismo fenómeno.

El análisis de cuestiones de los datos muestra también que a las susceptibilidades fraccionales más bajas, la afinidad del receptor fue más alta en presencia de las nucleótidos de guanina. Esta diferencia en afinidades se lo que involucra la misma magnitud que la observada por el tratamiento con la toxina paratuberculosa, lo que podría sugerir que los nucleótidos de guanina producen los efectos diferentes de la afinidad de unión del receptor para los antagonistas (o el incremento en la afinidad de unión del antagonista) (dependientemente de la susceptibilidad del receptor), y la inducción de cooperatividad positiva en la unión del [3H]-DBS (dependientemente de la susceptibilidad del receptor).

La cooperatividad positiva inducida por las nucleótidos de guanina se parece ser modificada por el tratamiento con la toxina paratuberculosa, lo que indica aunque no lo prueba en forma definitiva) que estos efectos probablemente pudieran estar

facilitador en este proceso.

Datos adicionales no mostrados en la presente tesis, señalan que la cooperatividad positiva inducida por los nucleótidos de guanine fue dependiente de la concentración de GTP, y que el orden de potencia de una serie de nucleótidos para la inducción de este efecto es: $GTP \gg CTP \gg UTP \gg ATP$. El GMP, el ATP, no mostraron ningún efecto.

1177. REFERENCES:

- 1) Chikmagal, R.D. (1980) Study of Adrenotropic receptors. *Ann. J. Physiol.* 138, 784-790.
- 2) Lunde, A.M., Arnold, A., McAdams, J.F., Ludgren, P.F. and Brown, T.G. (1967) Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature (London)* 214, 507-509.
- 3) Lees, G.M. (a) *Witch-Hikens' guide to the galaxy of adrenoreceptors* (1981) *Br. Med. J.* 283, 173-175.
- 4) Shanks, R.C. (1980) The clinical use of beta-adrenoceptor blocking drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 3, 400-407.
- 5) Langer, S.Z. (1979) Enzymatic regulation of catecholamine release. *Biochem. Pharmacol.* 28, 1793-1800.
- 6) Deegan, R.R. (1980) Relative agonist potency as a means of differentiating alpha-adrenoceptors and alpha-adrenergic mechanisms. *Clin. Sci.* 79, Suppl 10, 9-14s.
- 7) Timmermans, P.B.M.H.M. and Van Esbelen, P.A. (1981) The postsynaptic alpha-adrenoceptor. *J. Auton. Pharmacol.* 1, 171-182.
- 8) Williams, L.T. and Lefkowitz, R.J. (1978) Receptor binding studies in adrenergic pharmacology. Raven Press, New York.
- 9) Nancy, G.J. and Graham, R.M. (1980) Molecular characterization of adrenergic receptors. *Circ. Res.* 46, 400-400.
- 10) Graham, R.M., Hase, H.J. and Nancy, G.J. (1982) Stabilization and purification of the alpha₁ adrenergic receptor using a novel affinity resin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 2104-2108.
- 11) Wood, G.L., Garen, M.C. and Lefkowitz, R.J. (1979)

- Separation of solubilized alpha and beta adrenergic receptors by affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 88, 148
- 129 Geron, M.G., Leese-Youngberg, L.M.F., Stricker, C.D., Dickinson, M.D.F., Dickel, W.M., Jan, T. and Lefkowitz, R.J. (1980) Molecular biology of adrenergic receptors in the rat and frog central nervous system. *Hypertension* 8, Suppl. II, 11-22-11-27.
- 130 Nambi, S., Gilkey, D.R., Geron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1984). Photoaffinity labeling of beta-adrenergic receptors in mammalian bladder. *Biochem. Pharmacol.* 33, 2819-2822.
- 131 Levin, T.M., Nambi, S.L., Jaffe, R.M., Chan, R.G.H., Lefkowitz, R.J. and Geron, M.G. (1981). Photoaffinity labeling of the beta-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 256, 11046-11050.
- 132 Fraser, G.M., and Venter, J.C. (1980) Monoclonal antibodies to beta-adrenergic receptors: Use in purification and molecular characterization of beta receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 7004-7009.
- 133 Fraser, G.M., Gregorini, S., Esch, S and Venter, J.C. (1983). Antisera/antibodies and monoclonal antibodies in the purification and molecular characterization of neurotransmitter receptors. *J. Cell. Biochem.* 21, 217-221.
- 134 Segal, J.M., de Marinis, R.M., Geron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1986) Identification of the agonist-binding site of alpha adrenergic receptors using [³H] phenoxybenzamine. *J. Biol. Chem.* 261, 7046-7050.

- 199 Kelleher, D.J., Reichsteig, A., Roche, A.E. and Johnson, G.L. (1982) Rapid vesicle reconstitition of alphanolol-sophorose-purified beta1 adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 257, 12281-12285.
- 200 Hamey, G.J., Reuben, G.C., Gantaway, J. and Egan, D. (1982) Purification and characterization of the mammalian beta2-adrenergic receptor. *Biochemistry* 21, 321-323.
- 201 Lewis, T.H., Nambi, P., Weid, G.L., Saffa, P.M., Lefkowitz, B.J. and Garavito, M.S. (1982). [¹²⁵I]-labeled p-azidoisoprenaline, a photoaffinity label for the beta-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 257, 12312-12316.
- 212 Roche, A.E., Hall, G.C. and Reichsteig, A. (1983) Use of photolabels to probe de Mo, N-termini and the beta-adrenergic receptor. *Ted. Proc.* 12, 2237-2241.
- 221 Burgemeister, M., Halpern, H. and Helmslich, E.J.M. (1982). Photoaffinity labeling of the beta adrenergic receptor with azido derivatives of isoproterenol. *J. Biol. Chem.* 257, 5224-
- 230 Goldson, G.F., Moss, H.J., Hamey, G.J. and Graham, R.M. (1982) Synthesis and characterization of a radiolabeled photoaffinity probe for the alpha1-adrenergic receptor. *Hypertension & Suppl* 10, 741.
- 240 Goldson, G.F., Moss, H.J., Hamey, G.J. and Graham, R.M. (1982) Photoaffinity labeling of the alpha1-adrenergic receptor using an [¹²⁵I] acrylonide analog of prazosin. *Biochemistry* 21, 3763-3765.
- 250 Atlas, G., Stone, M.L. (1982) Guanidine piazotrisophanate, an affinity label for alpha2-adrenergic receptors in human

- platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 1979-1982.
- 267 Wenter, J.C., Fraser, G.M. and MacLachlan, L.C. (1980) Antisitesities to beta-2-adrenergic receptors: A possible source of adrenergic hypersensitivity in allergic rhinitis and asthma. *Diagn. 307*, 1041-1043.
- 271 Uaga, T. (1980) Molecular size of muscarinic acetylcholine receptors of rat brain. *FEBS Lett.* 113, 40-42.
- 289 Wenter, J.C. and Fraser, G.M. (1980) The structure of alpha and beta adrenergic receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 4, 256-270.
- 291 Kupsa, G., Kir, M.M., Gregorich, R. and Wenter, J.C. (1980). Selective affinity, labelling and molecular characterization of hepatic alpha-1 adrenergic receptors with [³H] phenoxybenzamine. *J. Biol. Chem.* 255, 322-322.
- 301 Wenter, J.C., Graham, J.C., McWilliams, D.R., and Fraser, G.M. (1980) Molecular size of the human platelet alpha-adrenergic receptor as determined by radiation inactivation. *Diagn. 307*, 1041-1043.
- 313 Nallapa, T.D., Lee, P.H., Fawcett, H.G., Hampner, E., Schlegel, M. and Reddell, M. (1980). Structure of the turkey erythrocyte adenylyate cyclase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 702-704.
- 323 Dale, M.M. (1977) The action of certain esters and esters and ethers of choline and their relation to muscarine. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1, 147-152.
- 333 Meyer, S.E. Neurochemical transmission and the autonomic nervous system. In: *The pharmacological basis of therapeutics*

- Goodman-Gilman, A., Goodman, L.S., and Gilman, A. Eds. *McMillan Publishing Co., Inc.* New York. Chapter 4, p. 33-70, 1980.
- 34) Heidmann, T. and Changeux, J.P. (1978) Structural and functional properties of the acetylcholine receptor protein in its purified and membrane bound states. *Ann. Rev. Biochem.* 47, 517-557.
- 35) Marshall, H.D. (1978) Mechanisms of slow postsynaptic potentials. *Nature (London)* 271, 335-341.
- 36) Dingicht, D. (1978) Structural requirements for muscarinic receptor recognition and receptor activation by oxotremorine analogs in the guinea pig ileum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222, 47-50.
- 37) Eglee, R.M. and Whiting, R.L. (1978) Determination of the muscarinic receptor subtype mediating vasodilation. *Br. J. Pharmacol.* 64, 2-8.
- 38) Surshchik, R.F. and Cheng, R.D. (1978) The muscarinic receptor of vascular endothelium that mediates vasodilation. *Trends Pharmacol. Sci. Suppl.* 1, 43-48.
- 39) Birdsell, N.J.M. and Mulne, E.C. (1974) Biochemical studies on muscarinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.* 27, 7-16.
- 40) Birdsell, N.J.M. and Mulne, E.C. (1975) Muscarinic receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* 6, 457-463.
- 41) Myer, R., Baric, G.F., Birdsell, N.J.M., Surgen, A.E.M., Mulne, E.C. (1978) Pilocarpine distinguished between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature* 273, 98-99.

- 42) Scatena, J. (1977) Do pirenzepine distinguish between "subtypes" of muscarinic receptors? Br. J. Pharmacol. 77, 567-570.
- 43) Hattler, G., Koltinger, W. and Messler, J. (1978). Pirenzepine does not discriminate between pre- and postsynaptic muscarinic receptors in guinea-pig small intestine. Scand. J. Gastroenterol. 17 (Suppl. 70), 67-70.
- 44) Burgen, A.S.H. and Spere, L. (1978) The action of acetylcholine and other drugs on the efflux of potassium and rubidium from smooth muscle of the guinea-pig intestine. Br. J. Pharmacol. 64, 97-113.
- 45) Balcar, T.D. (1978) Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. Physiol. Rev. 57, 505-718.
- 46) Yamamura, H.I. and Snyder, D.M. (1977) Muscarinic cholinergic receptor binding in the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum with [³H]quinacridine benzoate. Mol. Pharmacol. 18, 811-817.
- 47) Madden, T.M., Cohen, A.D. and Smith, M.H. (1982) Differential modification of the interaction of cardiac muscarinic cholinergic and beta-adrenergic receptors with a guanine nucleotide binding component. Mol. Pharmacol. 21, 570-580.
- 48) Goldberg, M.D. and Madden, M.M. (1977) Cyclic GMP metabolism and involvement in biological regulation. Ann. Rev. Biochem. 46, 883-921.
- 49) Evans, T., Smith, M.H., Tanner, L.J. and Madden, T.M. (1984) Muscarinic cholinergic receptors of the cell line regulate

- cyclic GMP metabolism by different molecular mechanisms. *Mol. Pharmacol.* 24, 101-104.
- 50) Brown, J.M. and Brown, J.L. (1984) Agents that differentiate muscarinic receptors that inhibit cyclic GMP formation from those that stimulate phosphoinositide metabolism. *J. Biol. Chem.* 259, 2777-2781.
- 51) Brown, G.L. and Brown, J.M. (1985) Muscarinic stimulation of phosphatidylinositol metabolism in atria. *Mol. Pharmacol.* 24, 251-256.
- 52) Brown, G.L., Marden, D.C. and Schimonek, H.J. (1981). Solubilization of the atrial muscarinic acetylcholine receptor: a new detergent system and rapid assays. *Anal. Biochem.* 115, 221-228.
- 53) Vanderhoydt, P., Dele, G., Dicker, J.R. and Vauquelin G. (1982). Opoid mediated conformational changes of solubilized $\alpha 1$ form of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.* 33, 2701-2707.
- 54) Roote, H.P. and Wexler, R.C. (1984) The differential loss of [3 H] pirenzepine or [3 H] equibindinylthoxyrate binding to soluble rat atrial muscarinic receptors indicates that pirenzepine binds to an allosteric state of muscarinic receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 700-707.
- 55) Wanger, D.W., Pathakary, M. and Aronstein, R.S. (1985) Regional heterogeneity of muscarinic acetylcholine receptors from rat brain is retained after detergent solubilization. *Neurosci. Lett.* 21, 15-18.
- 56) Oquendo, R.M., Wanger, D.W. and Aronstein, R.S. (1985) Biphasic regulation of detergent-solubilized muscarinic

- acetylcholine receptors from rat cerebral cortex by N-ethylmaleimide. Fed. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 47, 465-468.
- 579 Birdsell, M.J.H., Dargatzis, A.C.M. and Hulme, E.C. (1977) A study of the muscarinic receptor by gel electrophoresis. Br. J. Pharmacol. 41, 607-640.
- 580 Nagai, T. (1980). Maturation site of muscarinic acetylcholine receptors of rat brain. FEBS Lett. 118, 18-22.
- 581 Wentler, J.C. (1982) Muscarinic receptor structure. J. Biol. Chem. 257, 4062-4068.
- 582 Wentler, J.C., Eddy, D., Hall, L.M. and Fraser, C.H. (1984). Monoclonal antibodies detect the conservation of muscarinic cholinergic receptor structure from frogfish, *Amphiprion*, to human brain and detect specific structural homology with alpha-adrenergic receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 272-276.
- 583 Rinken, G.A., Langst, U.H. and Jara, G.L. (1984). Colocalization of muscarinic receptor and receptor associated glycoprotein receptor with digitonin. Biol. Membranes 3, 241-242.
- 584 Rotrosch, C.L., Herron, C.G., Venzel, H., Fullerton, D.B. and Gehlert D., H.G. (1983). Purification of the muscarinic acetylcholine receptor from porcine ataxia. Fed. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 1222-1227.
- 585 Shroeder, G.M., Brecke, M.F. and Wentler, J.C. (1984) Partial functional reconstitution of the α -Bungarotoxin muscarinic cholinergic receptor. J. Biol. Chem. 259, 12393-12398.

- 477 Florio, M.A. and Chernick, P.S. (1980) Reconstitution of reconstituted muscarinic cholinergic receptors with purified GTP binding proteins. *J. Biol. Chem.* 255, 2477-2482.
- 478 Maddipati, K.R., Chakrabarti, S., Eisenberg, E., Engel, M., Crane, M. and Matal, M. (1980) Purification of acetylcholine receptors, reconstitution into lipid vesicles and study of agonist-induced cation channel regulation. *J. Biol. Chem.* 255, 2212-2218.
- 479 Gerstein, R.G., Gibby, E.R., Sedina, J., Sanchez, J.L., Hinkley, J., Neary, E.J., Birnbaumer, L., Garon, H.G. and Indichits, D.J. (1980) Reconstitution of a hormone-sensitive adenylyl cyclase system. *J. Biol. Chem.* 255, 2227-2232.
- 480 Green, T., Robinson, G.S., Scott, C.H. and Ross, E.H. (1980) Reconstitution of methionine stimulated binding of guanosine triphosphate (GTP) to the stimulatory GTP-binding protein of adenylyl cyclase. *Biochemistry*, 19, 2420-2427.
- 481 Shattuck-Belcher, E.M., Fuller, G.A., Butcher, R.H. (1980) Some aspects of the biological role of adenosine 3',5'-cyclic phosphoric acid (cAMP). *Calculation* 17, 277-287.
- 482 Gurbach, G.D. (1980) Polypeptide and union hormone regulation of adenylyl cyclase. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 219-244.
- 483 Grand, M.P., Goldberg, M.D. and Winkler, D.B. (1980) Histamine receptors in adipose tissue: involvement of cyclic adenosine monophosphate and the H₂-receptor in the lipolytic response to histamine in isolated canine fat cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 195, 174-184.

- 467 Florio, M.G. and Sternweis, I.D. (1985) Reconstitution of reconstituted muscarinic cholinergic receptors with purified GTP binding proteins. *J. Biol. Chem.* **260**, 2477-2480.
- 468 Lindblom, J., Ostrom, T., Einarson, E., Engel, M., Oane, M. and Martini, M. (1986), Purification of muscarinic receptors, reconstitution into lipid vesicles and study of agonist-induced cation channel regulation. *J. Biol. Chem.* **261**, 2240-2243.
- 469 Coricane, P.A., Dillip, S.R., Sedina, J., Benovic, J.L., Hinkle, J., Neer, E.J., Birbaumer, L., Garon, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1986) Reconstitution of a hormone-sensitive adenylyl cyclase system. *J. Biol. Chem.* **261**, 2777-2782.
- 470 Osoeg, T., Takahawa, S.E., Scott, C.M. and Ross, H.N. (1984). Reconstitution of histaminamine stimulated binding of guanosine 5'-G-pppGp to the stimulatory, GTP-binding protein of adenylyl cyclase. *Biochemistry*, **23**, 2430-2437.
- 481 Clapham, D.M., Salazar, S.A., Dicker, R.H. (1983) Some aspects of the biological role of adenosine 3',5'-bisphosphate cyclic AMP. *Circulation* **67**, 277-284.
- 482 Gurbach, G.D. (1980) Polypeptide and cyclic hormone regulation of adenylyl cyclase. *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 173-184.
- 483 Gaud, M.P., Goldberg, M.D. and Manningham, D.E. (1979). Histamine receptors in adipose tissue: involvement of cyclic adenosine monophosphate and the H₂ receptor in the lipolytic response to histamine in isolated canine fat cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **195**, 174-184.

- 719 Fain, J.N. and Garcia-Sáinz, J.A. (1980) Role of phosphatidyl inositol in alpha and of adenylylate cyclase inhibition in alpha effects of catecholamines. *Life Sci.* 26, 1183-1184.
- 720 Garcia, M.J., Ayres, G.A., Wallace, R.H. and Bennett, E.L. (1980) Barbituric acid uncoupled dopamine agonist inhibition of prolactin release. *Am. J. Physiol.* 239, E287-E291.
- 721 London, S., Cooper, D.M.T. and Wolfe, J. (1980). Subclasses of cortical adrenergic receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 2751-2755.
- 722 Garcia-Sáinz, J.A. (1981) Decreased sensitivity to alpha-adrenergic amines, adenosine and prostaglandins in white fat cells from neonates treated with pentobarbital. *FEBS Lett.* 126, 231-233.
- 723 Cornejo, G. and Garcia-Sáinz, J.A. (1981). Alpha-adrenergic receptor activation stimulates endogenesis in rat hepatocytes. *Exp. J. Pharmacol.* 72, 287-290.
- 724 Carver, D. and Garcia-Sáinz, J.A. (1981) Vasopressin and Angiotensin II stimulate endogenesis through increased mitochondrial citric acid production. *Life Sci.* 31, 2471-2473.
- 725 Cuadras-Rodrigo, E.J., Huerta-Botana, J. and Garcia-Sáinz, J.A. (1980). Angiotensin II inhibits the accumulation of cyclic AMP produced by glucagon but not its metabolic effects. *FEBS Lett.* 113, 184.
- 726 Huerta-Botana, J., Millaiche-Ojalvo, E. and Garcia-Sáinz, J.A. (1980) Roles of alpha and beta-adrenergic receptors in adrenergic responsiveness of liver cells after partial hepatectomy. *Biochim. Biophys. Acta.* 702, 112-117.
- 727 Huerta-Botana, J., Millaiche-Ojalvo, E. and Garcia-Sáinz, J.A.

80. (1982) Sensitivity of liver cells formed after partial hepatectomy to glucagon, vasopressin and angiotensin II. *Biochim. Biophys. Acta* 720, 120-124.
- 81) Mierke-Daher, J., and Garcia-Sainz, J.A. (1983) Insulin administration restores to sensitivity of liver cells formed during liver regeneration to alpha-adrenergic amines, vasopressin and angiotensin II. *Biochim. Biophys. Acta* 720, 105-109.
- 82) Correas, G., Hernandez-Solano, P.M.T., and Garcia-Sainz, J.A. (1984). Modulation by thyroid status of cyclic AMP dependent and GTP-dependent mechanisms of hormone action in rat liver cells. Possible involvement of two different transduction mechanisms in alpha-adrenergic action. *Biochim. Biophys. Acta* 800, 97-105.
- 83) Bano, E.O., Franklin, R., Palmer, D., Kirk, G.J. and Michell, P.M. (1984) Rapid accumulation of inositol phosphates in isolated rat superior cervical sympathetic ganglia exposed to N-vanopressin and muscarinic cholinergic stimulation. *Electro. J.* 221, 800-811.
- 84) Mikolajewicz, T., and Garcia-Sainz, J.A. (1983) Histaminergic activation stimulates phosphatidylinositol labeling in rabbit liver. *Eur. J. Pharmacol.* 99, 457-467.
- 85) Redbell, M. (1980) The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature (London)* 284, 17-20.
- 86) Michel, T. and Lecherle, R.J. (1982) Hormonal inhibition of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 257, 10557-10562.

- 859 Avramides, M., Schmitt, G. and Falck, R.H. (1983) Cholera toxin inhibits prostaglandin E₂ but not adrenaline-induced stimulation of GTP hydrolysis in human platelet membranes. *FEBS Lett.* 146, 45-49.
- 870 Field, M. (1971) Intestinal Secretion: Effect of cyclic AMP and its role in cholera. *N. Eng. J. Med.* 281, 1187-1194.
- 880 Igarashi, M., and Montanucci, G. (1976) Lipid insertion of cholera toxin after binding to G_i-containing liposomes. *J. Biol. Chem.* 251, 11177-11181.
- 890 Fishman, P.M. (1982) Role of membrane gangliosides in the binding and action of bacterial toxins. *J. Membrane Biol.* 67, 65-87.
- 900 Moss, J. and Vaughan, M. (1977) Activation of adenylyl cyclase by cholera toxin. *Ann. Rev. Biochem.* 46, 501-530.
- 910 Haggren, J. and Fishman, P.M. (1981) Inhibitors of protein synthesis block action of cholera toxin. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 99, 157-161.
- 920 Moss, J., Stanley, S.J., Morin, J.E., and Eisen, J.E. (1980) Activation of cholera toxin by lipid-protein bilipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 255, 11029-11037.
- 930 Gill, D.M. (1978) Involvement of nicotinamide adenine dinucleotide in the action of cholera toxin in *Vibrio*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 2894-2898.
- 940 Moss, J., Osborne, J.C., Fishman, P.M., Brown, H.E., Vaughan, M. and Reed, P.C. (1977) Effect of gangliosides and substrate analogues on the hydrolysis of nicotinamide adenine dinucleotide by cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 76-79.

- 979 Moss, J. and Vaughan, M. (1970) Isolation of an avian erythrocyte protein possessing ADP-ribosyltransferase activity and capable of inactivating adenylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **67**, 2421-2424.
- 980 Northrup, J.M., Faigel, M.E. and Sidman, A.D. (1982) The guanine nucleotide binding site of the regulatory component of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **257**, 11418-11422.
- 978 Terferling, I.G. and Goldstein A. (1970) Histamine shock in mice sensitized with hemophilus pertussis vaccine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **22**, 311-318.
- 989 Sugi, T. and Mi, M. (1978) Potentiation of the adrenergic beta₂ receptor-mediated insulin secretion in pertussis sensitized rats. *Endocrinology* **103**, 252-255.
- 990 Yajima, Mas. Harada, M., Haseguchi, Y., Nakamura, I., Takahashi, S. and Mi, M. (1978) Biological Properties of Insulin Activating Protein (IAP) purified from the culture medium of Escherichia coli. *J. Biochem.* **83**, 205-212.
- 1001 Miyada, T. and Mi, M. (1977) Effect of in vivo pretreatment of rats with insulin protein purified from Escherichia coli nonmuscle cells upon secretion of insulin: Role of calcium. *Endocrinology* **101**, 1022-1027.
- 1012 Miyada, T. and Mi, M. (1977) Insulin activating proteins: Enhanced insulin secretion and specific cAMP accumulation in pancreatic islets due to utilization of native calcium ionophores. *J. Biol. Chem.* **252**, 447-473.
- 1023 Smith, R.H. and Parle, D. (1972). Neuropharmacology of the

- pancreatic islets. *Gen. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 12, 288-307.
- 108) Willmetts-Mellor, T. and Garcia-Sainz, J.A. (1981) Effects of pertussis toxin on the lipid metabolism of hamsters. *Life Sci.* 30, 1001-1004.
- 109) Hataki, O. and Ui, M. (1981) Modification by islet-activating protein of receptor-mediated regulation of cyclic AMP accumulation in isolated rat nasal cells. *J. Biol. Chem.* 256, 2084-2090.
- 110) Kurita, M., Matsui, T., Amano, T., and Ui, M. (1980) Specific uncoupling by islet-activating protein, pertussis toxin, of negative signal transduction via alpha adrenergic, cholinergic, and opiate receptors in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J. Biol. Chem.* 255, 4373-4375.
- 111) Lopez, M., Lopez, E., Ramirez, R., Aguilera, H., Martinez-Olmedo, M.A. and Garcia-Sainz, J.A. (1984) Pertussis toxin blocks the action of morphine, norepinephrine and alendidine on isolated guinea-pig ileum. *Rev. I. Farmacol.* 100, 277-280.
- 112) Katada, T. and Ui, M. (1982) Modulation by islet-activating protein of adenylate cyclase activity in C3 glioma cells. *J. Biol. Chem.* 257, 2703-2704.
- 113) Katada, T. and Ui, M. (1982) ADP-ribosylation of specific membrane proteins of C3 cells by islet-activating protein associated with modification of adenylate cyclase activity. *J. Biol. Chem.* 257, 7210-7212.
- 114) Katada, T. and Ui, M. (1982) Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating

protein due to GTP-ribosylation of a membrane protein. *FEBS Lett.* **1981**, *113*, 211-214.

- 1107 Tamura, M., Magimari, H., Murai, G., Masima, H., Ito, M., Kikuchi, T., Mi, M. and Ishii, S. (1980). Subunit structure of isolated rat protein, pertussis toxin, in conformity with G-B model. *Biochemistry*, **19**, 2019-2022.
- 1108 Matsuda, T., Tamura, M. and Mi, M. (1980). The A. protomer of isolated rat protein, pertussis toxin, is an active peptide catalyzing GTP-ribosylation of a membrane protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **198**, 280-285.
- 1109 Morano, F.J., Mills, J., Garcia-Sainz, J.A. and Fain, J.H. (1980). Effects of pertussis toxin treatment on the metabolism of rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **255**, 10738-10740.
- 1110 Matsuda, T. and Mi, M. (1981) In vitro effects of isolated rat protein on cultured rat pancreatic islets. Enhancement of insulin secretion, adenosine 3',5' monophosphate accumulation and ^{45}Ca flow. *J. Biochem.* **89**, 373-380.
- 1111 Sawyer, J.L., Rosados, G. and Garcia-Sainz, J.A. (1980) Effect of pertussis toxin on alpha adrenoceptors of the circulatory system of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **63**, 123-124.
- 1112 Sawyer, J.L., Rosados, G., Rosados, G. and Garcia-Sainz, J.A. (1980) Pertussis toxin induces tachycardia and impairs the increase in blood pressure induced by alpha-adrenergic agonists. *Life Sci.* **20**, 2107-2109.

- inhibitors in rat adipocytes. FEBS Lett. 120, 60-71.
- 1232) Altman, M., Schulte, D., and Ischia, M.H. (1978) Adenylate cyclase inhibition and cGMPase stimulation by somatostatin in 3T3 lymphoma cell hybrids are prevented by histone-activating proteins. FEBS Lett. 100, 140-143.
- 1241) Eric, J.M., O'Donnell, C.J., Miller, I. and Garcia-Sainz, J.C. (1978) Pertussis toxin reverses Sp-NNHD inhibition of basal and forskolin-stimulated adipocyte adenylate cyclase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 471-474.
- 1251) Garcia, M.J., Lopez, M.D., Myers, C.A. and Hewlett, E.L. (1978) Pertussis toxin blocks the somatostatin-induced inhibition of growth hormone release and adenylate cyclase-stimulated cAMP accumulation. Endocrinology, 103, 209-213.
- 1252) Erlinge, T.D., Zhang, Y., and Sjöberg, R.L. (1978) Pertussis toxin blocks somatostatin's inhibition of stimulated cyclic AMP accumulation in anterior pituitary cells. Biochim. Biophys. Res. Commun. 85, 701-703.
- 1272) Pedraza-Chavez, J., Alvarez-Sanchez, M.G., Herrera-Rubio, M.F. and Garcia-Sainz, J.C. (1978). Effect of pertussis toxin on the adrenergic regulation of plasma renin activity. Life Sci. 27, 1403-1408.
- 1282) Gilman, A.G. (1978). Guanine nucleotide-binding regulatory proteins and dual control of adenylate cyclase. J. Clin. Invest. 72, 1-4.
- 1283) Casper, D.M.F. (1978) Bimodal Regulation of adenylate cyclase. FEBS Lett. 100, 477-480.
- 1287) Yimwaski, G., Stein, R.J., Chernoff, N. and Bitensky, M.M.

- 11993) Activation mechanism of G12G guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* 268, 21003-21006.
- 101) Beckersart, G. and Gomperts, B.D. (1985). Role of guanine nucleotide binding proteins in the activation of phosphoinositide phosphodiesterase. *Nature* (London) 314, 534-536.
- 102) Suter, T., Martin, M.M., Hughes, A.R. and Harden, T.H. (1985). Guanine nucleotide-reversible, high affinity binding of carbachol to muscarinic cholinergic receptors of 102001 receptors is not as sensitive to pertussis toxin. *Br. J. Pharmacol.* 97, 22-27.
- 103) Hildebrandt, J.D., Sideris, J., Ristinger, R. and Birnbaumer, L. (1984) Identification of a subunit associated with the adenylyl cyclase regulatory proteins Na and K1. *J. Biol. Chem.* 259, 2037-2042.
- 104) Eckstein, G.M., Hated, T., Northup, J.M., Li, H., and Gilman, A.G. (1984) Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulator component of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 259, 2210-2217.
- 105) Northup, J.M., Gajda, M.D., Sternbach, F.G., and Gilman, A.G. (1980) The subunit of the stimulatory regulatory component of adenylyl cyclase. Resolution of the extracted 47,000 Dalton (alpha) subunit. *J. Biol. Chem.* 255, 11855-11858.
- 106) Maitan, C.G., Popiayko, P.J. and Baroja-Sainz, J.A. (1984). Pertussis toxin and G12G: the ADP-ribosylation of two distinct peptides, 40 and 41 kDa in rat fat cell membranes. *FEBS Lett.* 171, 281-284.

- 1271 Frankl, S.D., Assad, T., Pedersen, C.D., and Ross, E.H. (1988). Reconstitution of catecholamine-stimulated phosphoinositidase activity. *Biochemistry*, **27**, 4837-4840.
- 1282 Gessel, D. and Selinger, D. (1978) Mechanism of adenylate cyclase activation through the beta-adrenergic receptor: catecholamine-induced displacement of bound GDF. *B, STP. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 3155-3159.
- 1292 Gys, L.J. and Lefkowitz, S.J. (1981) Correlation of beta-adrenergic receptor-stimulated [³H]GDF release and adenylate cyclase activation. *J. Biol. Chem.* **256**, 2207-2212.
- 1301 Northup, J.M., Sternweis, P.C., and Gilman, A.G. (1980). The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. Isolation, activity, and properties of the 37,000-dalton (beta) subunit. *J. Biol. Chem.* **255**, 11841-11846.
- 1311 Matsuda, T., Northup, J.M., Bokoch, G.M., Yi, H., and Gilman, A.G. (1981). The inhibitory, guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **256**, 2570-2575.
- 1321 Matsuda, T., Bokoch, G.M., Ingel, M.D., Yi, H. and Gilman, A.G. (1984). The inhibitory, guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **259**, 2584-2588.
- 1421 Metcalfe, M.J. and Insel, P.A. (1983) ADF-and epinephrine-elicited release of [³H] guanylylthioldiphosphate from platelet membranes. *FEBS Lett.* **159**, 10-

- 1440 Michel, T. and Lefkowitz, R.J.M. (1980) Hormonal inhibition of adenylate cyclase. Alpha₂-adrenergic receptors promote release of [³H] guanylinucleoside diphosphate from platelet membranes. *J. Biol. Chem.* 255, 18000-18006.
- 1450 Muramatsu, T. and Ull, M. (1980) Loss of the inhibitory function of guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase due to its ADP-ribosylation by interactivating protein, pertussis toxin, in adipocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 255, 6610-6614.
- 1460 Nishio, M.R., and Manning, L.H. (1980) Enzyme secretion and the incorporation of [³²P] into phospholipids of pancreas slices. *J. Biol. Chem.* 255, 617-627.
- 1470 Nishio, M.R., and Chernin, A.L. (1977) Protein secretion and phosphate turnover in the phospholipids of salivary glands in vitro. *J. Physiol. (London)* 107, 13-27.
- 1480 Oros, M., Lova, M. and Solinger, D. (1979) Involvement of alpha₂-adrenergic receptor in the phospholipid effect in rat parotid. *1980 Lett. 84, 173-176.*
- 1490 Mitchell, R.H. and Jones, L.H. (1979) Enhanced phospholipid-related labeling in rat parotid fragments exposed to alpha₂-adrenergic stimulation. *Biochem. J.* 185, 47-52.
- 1500 Friedel, P.O., Johnson, J.R. and Schanberg, S.M. (1979). Effects of sympathomimetic amines on incorporation in vivo of intracellously injected [³²P] into phospholipids of rat brain. *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 124, 503-507.
- 1510 Mitchell, R.H. (1977) Intrinsic phospholipid and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta* 410, 31-47.

- 1520 Bertridge, M.J. and Irvine, R.F. (1984) Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature (London)* 312, 318-321.
- 1521 Dayer, J.M., Condeelis, E. and Cantley, L.C. (1984) Differential effect of pertussis toxin on the affinity state for agonists of renal alpha- and alpha-2-adrenoceptors. *J. Biol. Chem.* 259, 3074-3077.
- 1522 Thomas, A.P., Alexander, J. and Williamson, J.R. (1984) Relationship between inositol phosphate production and the increase in cytosolic free Ca²⁺ induced by vasopressin in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 259, 3374-3376.
- 1523 Burgess, G.M., Gaffney, P.R., McKinnon, J.D., Davidge, M.J., Irvine, R.F. and Dukes, J.H. (1984) The second messenger linking receptor activation to internal Ca release in smooth muscle. *Nature (London)* 307, 42-44.
- 1524 Bertridge, M.J. (1984) Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220, 345-360.
- 1525 Michizuka, M. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature (London)* 308, 693-698.
- 1526 Saravali, G. and Garavito-Ramos, J.A. (1984) Phorbol esters inhibit alpha-1-adrenergic stimulation of glycogenolysis in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 1188-1192.
- 1527 Garavito-Ramos, J.A. (1985) Transmembrane receptor phosphorylation and protein kinases. *Trends Pharmacol. Sci.*

6, 181-189.

- 1480 May, N.G., Jacobs, B. and Castellanos, F. (1981). Association of phorbol ester-induced hyperphosphorylation and reversible regulation of transferrin membrane receptors in K562 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 2012-2020.
- 1481 Saez de Guila, J.A., Mendicino, P., and Martínez-Balado, N.A. (1987). Effect of phorbol esters on alpha₁-adrenergic-mediated glucagon mediated actions in isolated hepatocytes. *Biochem. J.* 239, 877-880.
- 1482 García-Gilja, J.O. and Hernández-Gotimayor, E.M.T. (1988). Stimulation of hepatic glycogenolysis by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) via cyclic-nucleoside products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152, 204-207.
- 1483 García-Gilja, J.O., Villalobos-Molina, R., Herrera, S., Martínez-Balado, N., Teague, C. and Hoffman, B.B. (1988). Differential effects of and phorbol esters on the alpha₁-adrenoceptors of hepatocytes and liver. *Eur. J. Pharmacol.* 142, 229-237.
- 1484 Corrales, G., Schwart, M.R., Siskin, R.H. and Garcia-Balado, N.A. (1988). Phorbol esters inhibit alpha₁-adrenergic effects and decrease the affinity of liver cell alpha₁-adrenergic receptors for clonidine. *J. Biol. Chem.* in press.
- 1485 Saez de Guila, J.A., Tuziá-Luna, M.I. and Hernández-Gotimayor, E.M.T. (1988). Phorbol esters, vasopressin and angiotensin II block alpha₁-adrenergic action in rat hepatocytes. Possible relation protein kinase C. *Enviado a publicación.*

- 1669 Garcia-Cardena, J.P., Weinshenker-Solomon, D.H.T. and Tuzi-Luna, M.T. (1984) Homologous and heterologous desensitization of one of the pathways of the alpha₁ adrenergic action. Effects of epinephrine, norepinephrine, angiotensin II and phorbol 12-myristate 13-acetate. Includes a publication.
- 1670 Bayar, J.M., Martínez-Sánchez, M., Monroy-Sánchez, J.A., Peceña, G. and García-Sáinz, J.A. (1988). Effect of perfractin toxin on the brain muscarinic-cholinergic receptors and their function. *Life Sci.* Includes a publication.
- 1680 Bayar, J.M., Martínez-Sánchez, M., Monroy-Sánchez, J.A., Peceña, G. and García-Sáinz, J.A. (1989) "Effect of perfractin toxin on the muscarinic receptor affinity" *Eur. J. Pharmacol.* Includes a publication.
- 1690 Bayar, J.M., Martínez-Sánchez, M., Monroy-Sánchez, J.A., Peceña, G. and García-Sáinz, J.A. (1989) Guanine nucleotide-induced positive cooperativity in muscarinic-cholinergic antagonist binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 173-177.
- 1700 Incel, D.G. and Szabó, M.D. (1982) Characterization of alpha₁-adrenergic receptor subtypes in the rat renal cortex. *Mol. Pharmacol.* 22, 332-334.
- 1710 Goodhardt, M., Ferry, M., Sargent E. and Hancock, J. (1982) Hepatic alpha₁-adrenergic receptors show agonist-specific regulation by guanine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 257, 11577-11580.

- 1727) Garretts-Ding, J.A., Gayer, J.L., Michel, T., Sawyer, B.,
 Willer, G.L., Tehinen, M. and Lefkowitz, R.J. (1984). Effect
 of pertussis toxin on alpha2-adrenergic mediated
 formation of the high-affinity state for agonists. FEBS
 Lett. 173, 25-28.
- 1728) Dunziger, E., de Leon, A. and Lefkowitz, R.J. (1982).
 Receptors' modulation of agonist and antagonist binding to
 muscarinic cholinergic receptor by guanine nucleotide. Fedt.
 Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 1732-1734.
- 1729) Cheng, J.D. and Tawfik, S.D. (1983) GTP increases affinity
 muscarinic antagonist binding sites: an effect regulated by
 Mg²⁺. Eur. J. Pharmacol. 92, 247-252.
- 1730) Murphy, M.M.M., and Duce, M. (1981). Obligatory role of a
 tetraethanol ammonium salt in guanine nucleotide
 regulation of [³H]-ACh binding to muscarinic acetylcholine
 receptors. Biochim. Biophys. Res. Commun. 113, 233-235.
- 1731) De Meyle, F. and Duth, J. (1978) Cooperativity in ligand
 binding: A thermodynamic analysis. Biochim. Biophys. Res.
 Commun. 84, 112-114.
- 1732) Graft, M., and Gato, M. (1978) Separation and characterization
 of two distinct binding sites contained in purified
 leukoagglutinating cells from *Eucalyptus tereticornis*.
 Biochim. Biophys. Acta. 547, 713-722.
- 1733) Lynch, G.T., Charvat, R., Blackmore, P.F., and Euton, J.H.
 (1983). Studies of the hepatic alpha2-adrenergic receptor.
 J. Biol. Chem. 258, 1333-1339.
- 1734) Park, J.M., Ledbetter, E.R., Smith, H.A., Sripaerament, S.,
 and Mirkinis, S.R. (1983) Baronyanal supraventricular

- bradycardia precipitated by pertussis toxin. *J. Pediatr.* 102, 202-207.
- 1901 Goddard, E.C., Jacobson, J.R., Widdowson, E.S.J., and Mansueti, A. (1952) Experimental bradycardia in infancy and childhood. *Arch. Pediatr.* 45, 241-
- 1910 Garcia-Ojeda, J.A., Ruiz-Puentes, J., Jimenez-Paredes, J., Gonzalez-Bachero, M. and Villaver-Pascua, N. (1980) Comparative biological activities of whole cell pertussis toxin and a new vacellifer preparation. *Vaccine* 8, 23-24.
- 1920 Martin, M.H., Smith, M.H., and Harden, T.M. (1984) Modulation of muscarinic cholinergic receptor affinity for catecholamine in rat heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238, 424-433.
- 1930 Meliani, D., Ellis, S.J.R., Estman, M.L., and Blumberg, L. (1987) Guanine nucleotide regulation of a mammalian myocardial muscarinic receptor system. Evidence for homo- and heterotropic cooperativity in ligand binding analyzed by computer-assisted curve fitting. *J. Biol. Chem.* 262, 7410-7421.